

Analyse Epstein-Barr Virus (EBV)- spezifischer virologischer und immunologischer Parameter bei EBV- assoziierten Erkrankungen und Patienten unter Immunsuppression

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) der
Naturwissenschaftlichen Fakultät III - Biologie und
Vorklinische Medizin der Universität Regensburg**

durchgeführt am
Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Birgit Weinberger

2005

Promotionsgesuch eingereicht am 04.07.2005

Die Arbeit wurde angeleitet von Prof. Wolfgang Jilg

Prüfungsausschuß: Prof. Stephan Schneuwly

Prof. Wolfgang Jilg

Prof. Armin Kurtz

Prof. Jürgen Heinze (Vorsitzender)

ZUSAMMENFASSUNG	6
1 EINLEITUNG	9
1.1 DIE FAMILIE DER HERPESVIRIDAE	9
1.2 EPSTEIN-BARR VIRUS	10
1.2.1 MORPHOLOGIE	10
1.2.2 NOMENKLATUR DER EBV-GENE	10
1.2.3 STADIEN EINER INFektion MIT DEM EPSTEIN-BARR VIRUS	11
Adsorption an die Zellmembran	11
Penetration und Uncoating	12
Assembly und Freisetzung neugebildeter Virionen	12
Latente Infektion und Übergang in den lytischen Zyklus	13
Transformation	16
1.2.4 IMMUNOLOGISCHE KONTROLLE VON EBV	17
Humorale Immunantwort	17
Zelluläre Immunantwort	18
1.2.5 PATHOGENESE UND KRANKHEITSBILDER	19
Infektiöse Mononukleose	19
Chronisch-aktive Infektion	19
X-linked lymphoproliferative syndrome (XLP) bei Primärinfektion mit EBV	20
Orale Haarleukoplakie	20
EBV-assoziierte Tumorerkrankungen	21
1.2.6 EPSTEIN-BARR VIRUS UND IMMUNSUPPRESSION	23
1.3 GRUNDLAGEN DER ORGANTRANSPLANTATION	27
1.3.1 NIERENTRANSPLANTATION (NTx)	27
1.3.2 ALLOGENE STAMMZELLTRANSPLANTATION (SZT)	28
1.3.3 KONDITIONIERUNG UND IMMUNSUPPRESSION	32
Konditionierung des Empfängers vor Stammzelltransplantation	32
Immunsuppression nach Transplantation	32
1.3.4 INFEKTIOLOGISCHE KOMPLIKATIONEN NACH TRANSPLANTATION	35
Infektionen nach Nierentransplantation	35
Infektionen nach Stammzelltransplantation	37
1.4 ZIEL DER ARBEIT	39
2 MATERIAL UND METHODEN	41
2.1 ZELLKULTUR	41
Eukaryontische Zelllinien	41

Ernte der Zellen	41
Einfrieren und Auftauen der Zellen	41
Induktion des lytischen Zyklus in EBV-positiven Zelllinien	41
2.2 PATIENTENKOLLEKTIV DER PROSPEKTIVEN STUDIE	42
2.3 SEROLOGIE	43
2.4 QUANTITATIVE PCR	44
Isolierung von peripheren Blutlymphozyten (PBL)	44
Präparation von DNA und DNA-freier RNA	44
Oligonukleotide	44
Klonierung von DNA zur Herstellung von DNA- und RNA-Verdünnungsreihen	47
<i>Real-time</i> PCR	51
2.5 ELISPOT-ASSAY	54
2.6 COMPUTERPROGRAMME	56
3 ERGEBNISSE	57
3.1 ETABLIERUNG VON PCR-SYSTEMEN ZUM NACHWEIS VIRALER DNA UND mRNA	57
3.1.1 HOCHSENSITIVE <i>REAL-TIME</i> PCR FÜR VIRALE DNA	57
3.1.2 QUANTITATIVE RT-PCR ZUM NACHWEIS VIRALER TRANSKRIPTS	59
Präparation DNA-freier RNA	60
Sensitivität der PCR-Systeme	62
Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit	64
3.1.3 EXPRESSION VIRALER GENE IN EBV-POSITIVEN ZELLINIEN	65
3.2 ANALYSE VIRALER PARAMETER BEI GESUNDEN TRÄGERN	67
3.3 ANALYSE VIRALER PARAMETER BEI EINZELNEN PATIENTEN	70
3.3.1 PATIENTEN MIT INFEKTIÖSER MONONUKLEOSE	70
3.3.2 PATIENTIN MIT FULMINANTER PRIMÄRINFektion	71
3.3.3 LYMPHOPROLIFERATIVES SYNDROM BEI EINEM PATIENTEN NACH STAMMZELLTRANSPLANTATION	72
3.3.4 NACHWEIS VON ERHÖHTER VIRALER AKTIVITÄT BEI EINEM PATIENTEN NACH STAMMZELLTRANSPLANTATION	74
3.4 PROSPEKTIVE STUDIE BEI PATIENTEN NACH NIEREN- BZW. STAMMZELLTRANSPLANTATION	75
3.4.1 GRUNDERKRANKUNGEN UND IMMUNSUPPRESSION DER PATIENTEN	76
3.4.2 ANALYSE EBV-SPEZIFISCHER ANTIKÖRPER	78
3.4.3 QUANTIFIZIERUNG VIRALER DNA	80
3.4.4 EXPRESSION LYTISCHER UND LATENTER GENE	81
3.4.5 DETEKTION EBV-SPEZIFISCHER CYTOTOXISCHER T-ZELLEN	83

4	DISKUSSION	86
4.1	QUANTIFIZIERUNG VON EBV-DNA BEI PATIENTEN UNTER IMMUNSUPPRESSION	86
4.2	QUALITATIVE UND QUANTITATIVE ANALYSE EPSTEIN-BARR-VIRALER MRNA	88
4.3	CYTOTOXISCHE T-ZELLEN ZUR IMMUNOLOGISCHEN KONTROLLE VON EBV	92
4.4	EXPRESSIONSMUSTER LYTISCHER UND LATENTER TRANSKRIPTS <i>IN VITRO</i> UND <i>IN VIVO</i>	94
5	ANHANG	99
5.1	IMMUNSUPPRESSION UND KONDITIONIERUNG DER PATIENTEN	99
5.2	SEROLOGIE, VIRUSLAST UND VIRALE EXPRESSION BEI PATIENTEN NACH TRANSPLANTATION	105
	LITERATURVERZEICHNIS	157
	EIGENE ARBEITEN	167
	DANKSAGUNG	169

Zusammenfassung

Mehr als 95% der erwachsenen Bevölkerung sind mit dem Epstein-Barr Virus infiziert. Nach der Primärinfektion persistiert das Virus lebenslang in ruhenden B-Zellen. Bei gesunden Trägern kommt es immer wieder zur Freisetzung des Virus im Bereich des Oropharynx. Das Immunsystem kontrolliert jedoch das Virus soweit, daß es nicht zur unkontrollierten Replikation des Virus oder zur Proliferation latent infizierter B-Zellen kommt.

Unter Immunsuppression (z.B. nach Transplantationen) kann dieses Gleichgewicht von viraler Aktivität und immunologischer Kontrolle jedoch gestört sein. Es kommt zu viralen Reaktivierungen und in einigen Prozent der Patienten zu EBV-assoziierten Lymphoproliferationen (PTLD; *post-transplant lymphoproliferative disease*).

In dieser Arbeit wurden sensitive *real-time* PCR-Systeme zur Quantifizierung viraler mRNAs des lytischen Zyklus und der Latenz etabliert um virale Expressionsmuster *in vitro* und *in vivo* detailliert zu analysieren. Dazu wurden Transkripte, die zu verschiedenen Zeitpunkten während des lytischen Zyklus exprimiert werden (BZLF1 [*immediate early*], BALF5 [*early*], BLLF1 [*late*]) und verschiedene latente Transkripte, die die unterschiedlichen in der Literatur beschriebenen Latenzformen repräsentieren (EBNA1, EBNA2, LMP1), ausgewählt. Da nicht alle dieser Transkripte gespleißt sind, bzw. im Falle von BLLF1 die Mengenverhältnisse der beiden Spleißvarianten variabel sind, wurden die Systeme so gewählt, daß mRNA unabhängig von Spleißvorgängen detektiert werden kann. Dazu wurde eine Methode, mit der zuverlässig DNA-freie RNA präpariert werden kann, etabliert, so daß keine sequenzbasierte Unterscheidung von RNA und DNA notwendig war. Die Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit aller Arbeitsschritte wurde eingehend geprüft, so daß die Methoden auch im Rahmen von Routine-Untersuchungen verwendet werden können.

Diese PCR-Systeme wurden eingesetzt, um die viralen Expressionsmuster in verschiedenen EBV-positiven Zelllinien zu charakterisieren. Dabei zeigte sich, daß die latenten Gene in allen Zelllinien stärker exprimiert werden als die lytischen Gene, was mit der Annahme, daß nur einige Prozent der Zellen *in vitro* spontan in den lytischen Zyklus eintreten, übereinstimmt.

Im Hauptteil der Arbeit wurde in Kombination mit serologischen Untersuchungen und einem ebenfalls neu etablierten System zur hochsensitiven Detektion EB-viraler DNA in Serum und isolierten Lymphozyten die virale Aktivität in gesunden Trägern und in Patienten mit EBV-assoziierten Erkrankungen detailliert untersucht. Die Expressionsanalysen bei verschiedenen Patientenkollektiven zeigten, daß sowohl bei gesunden Trägern als auch bei Patienten unter Immunsuppression alle untersuchten latenten Transkripte - wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß - exprimiert werden. Im Gegensatz zu der Annahme, daß in ruhenden B-Zellen gesunder Träger nur EBNA1 und eventuell LMP2A exprimiert werden, konnten in einem Teil der Probanden auch EBNA2- und LMP1-Transkripte nachgewiesen werden. In ca. 10% der Proben fand sich außerdem BLLF1-mRNA, was für einen Übergang des Virus in den lytischen Zyklus in diesen Zellen spricht. Die postulierten Latenzformen und Expressionsmuster scheinen also nicht allgemeingültig zu sein.

Im Rahmen einer über einen Zeitraum von 12 Monaten bei 47 Patienten nach Nieren- bzw. Stammzelltransplantation durchgeführten prospektiven Studie konnte bei Immunsupprimierten häufiger als in gesunden Trägern virale DNA in Lymphozyten nachgewiesen werden. Die Expression lytischer Gene war jedoch in beiden Kollektiven vergleichbar. Unterschiede zeigten sich in der Expression der latenten Gene, die unter Immunsuppression stärker exprimiert waren. Dies läßt den Schluß zu, daß die erhöhte Viruslast bei Patienten unter Immunsuppression nicht auf eine lytische Replikation des Virus, sondern vielmehr auf eine Expansion latent infizierter B-Zellen zurückzuführen ist. Keiner der 47 Patienten entwickelte während des Beobachtungszeitraumes eine EBV-assoziierte Lymphoproliferation, leicht erhöhte virale Aktivität reicht also als prognostischer Marker für eine PTLD nicht aus. Auch Schwankungen der Titer EBV-spezifischer Antikörper wurden als Indiz für mögliche EBV-assoziierte Komplikationen diskutiert. Der Vergleich der Patienten unter Immunsuppression mit gesunden Trägern zeigte jedoch, daß in beiden Kollektiven die Antikörpertiter im zeitlichen Verlauf stark schwankten, man also bei diesen Veränderungen keine Aussage über EBV-assoziierte Erkrankungen treffen kann.

Bei ausgewählten Patienten wurde außerdem die EBV-spezifische T-Zell-Antwort untersucht. Es zeigte sich, daß die Zahl spezifischer T-Zellen im zeitlichen Verlauf

auch bei gesunden Trägern stark schwankt und aus diesem Grund eine einmalige Untersuchung der T-Zell-Antwort nicht aussagekräftig ist. Die Untersuchungen an immunsupprimierten Patienten wurden deshalb ebenfalls über einen Zeitraum von einigen Monaten durchgeführt. Bei allen untersuchten Patienten konnten einige Wochen bzw. Monate nach Transplantation EBV-spezifische T-Zellen nachgewiesen werden. Die Zahl der spezifischen cytotoxischen T-Zellen unterschied sich dabei nicht von der in gesunden Trägern. Man kann also davon ausgehen, daß auch unter der heute üblichen Immunsuppression EBV in den meisten Fällen immunologisch kontrolliert werden kann.

1 Einleitung

1.1 Die Familie der Herpesviridae

EBV ist ein Mitglied der Familie der Herpesviridae. Infektionen mit Herpesviren findet man beim Menschen sowie bei vielen Wirbeltierarten. Allen Herpesviren gemeinsam ist die Fähigkeit nach der Primärinfektion eine latente Infektion im Körper zu etablieren. Im Gegensatz zur lytischen Vermehrung, in deren Verlauf die infizierten Zellen absterben, überleben latent infizierte Wirtszellen, da in diesem Stadium keine Nachkommenviren produziert werden und die Herpesviren verschiedene Strategien entwickelt haben, latent infizierte Zellen für das Immunsystem nicht erkennbar zu machen.

Innerhalb der Herpesviridae unterscheidet man aufgrund biologischer Eigenschaften und Pathogenitätsmechanismen drei Unterfamilien. α -Herpesviren persistieren meist in den Nervenzellen der Ganglien. Sie vermehren sich in kurzen Replikationszyklen und breiten sich in Zellkultur schnell aus. Humanpathogene Vertreter dieser Unterfamilie sind die Herpes-simplex- (HSV 1 und HSV 2) und die Varizella-Zoster-Viren, die beim Menschen Hautausschläge mit Bläschen verursachen. Im Gegensatz hierzu zeigen β -Herpesviren wie z. B. das humane Cytomegalievirus einen relativ langsamen Vermehrungszyklus sowohl *in vivo* als auch *in vitro*. γ -Herpesviren infizieren in erster Linie lymphoide Zellen, im Falle des Epstein-Barr Virus (EBV) B-Lymphozyten, in denen das Virus auch latent persistiert.

1.2 Epstein-Barr Virus

1.2.1 Morphologie

Wie alle Herpesviren besitzt das Epstein-Barr Virus ein lineares, doppelsträngiges DNA-Genom. Das je nach Stamm 172-186kb umfassende Genom codiert für ca. 100 Proteine (Baer et al., 1984). Innerhalb des Virions liegt die DNA um einen Proteinkern (core) gewickelt vor. Sie ist von einem ikosaedrischen Kapsid umgeben, das aus drei Kapsomerproteinen gebildet wird und einen Durchmesser von etwa 100 nm besitzt. Zwischen dem Kapsid und der Hüllmembran, in die virale Glykoproteine, hauptsächlich gp350/220 eingelagert sind, befindet sich das Tegument.

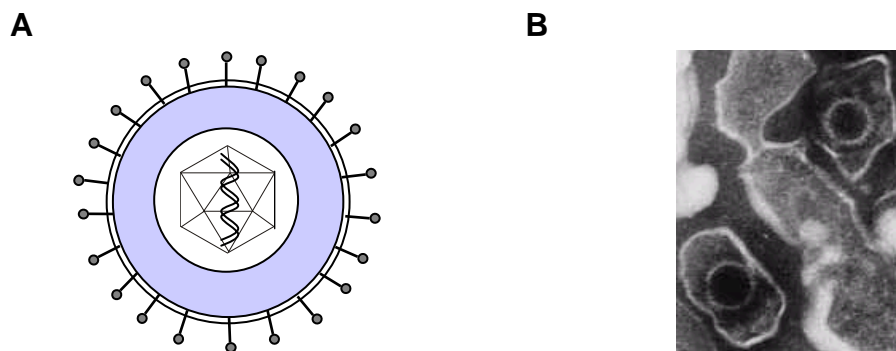


Abbildung. 1: A: Schematische Darstellung eines EB-Virions
B: Elektronenmikroskopische Aufnahme von EBV-Partikeln (Aufnahme: G.W. Bornkamm, GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, München)

1.2.2 Nomenklatur der EBV-Gene

Aufgrund des großen Genoms war es notwendig eine einheitliche Nomenklatur für Gene des EBV und die entsprechenden Proteine zu finden. Diese richtet sich nach den Genomfragmenten, die durch den Verdau mit dem Restriktionsenzym *Bam*HI entstehen. Das größte Fragment wird als A-, das zweitgrößte als B-Fragment usw. bezeichnet. Da man mehr Fragmente erhält als Buchstaben zur Verfügung stehen, wird nach dem Z-Fragment mit Kleinbuchstaben fortgefahren. Die einzelnen Leserahmen werden den Fragmenten zugeordnet und durchnummeriert. Dabei wird auch die Orientierung (rechte oder linke Leserichtung) berücksichtigt. So ergibt sich z.B. für das erste Gen, das auf dem L-Fragment in linker Leserichtung

liegt, die Bezeichnung BLLF1 (*Bam*HI, L-fragment, left frame 1). In dieser Arbeit werden sowohl Gene als auch die zugehörigen Transkripte mit dieser Nomenklatur bezeichnet. Proteine erhalten in der Regel den Zusatz -Protein oder -Antigen. Für die latenten Gene haben sich statt der Bezeichnung für die Leserahmen die Begriffe EBNA = *Epstein-Barr nuclear antigen* (EBNA1, 2, 3A, 3B, 3C und -LP [*leader protein*]) und LMP = *latent membrane protein* (LMP1, 2A und 2B) durchgesetzt. Die Glykoproteine werden in der Regel mit gp und dem entsprechenden Molekulargewicht abgekürzt. So werden z. B. die durch Spleißvarianten entstehenden BLLF1-Proteine auch als gp350/220 bezeichnet.

1.2.3 Stadien einer Infektion mit dem Epstein-Barr Virus

Adsorption an die Zellmembran

Die Adsorption viraler Partikel an B-Lymphozyten erfolgt über das virale Glykoprotein gp350/220, das sich auf der Membranhülle befindet. Dieses Protein bindet an den zellulären Komplement-Rezeptor CD21 (Nemerow & Cooper, 1984). Da EBV jedoch über den Speichel übertragen wird (Chang et al., 1973; Gerber et al., 1972), und auch in epithelialen Geweben Virus nachgewiesen werden kann, z. B. in Nasopharynxkarzinomen und bei oraler Haar-Leukoplakie (Greenspan et al., 1985), werden auch Epithelzellen als mögliche Zielzellen für EBV diskutiert. CD21 wird auf diesen Zellen jedoch nicht oder nur schwach exprimiert (Masucci & Ernberg, 1994), so daß man davon ausgeht, daß diese Zellen mittels alternativer Strategien infiziert werden. Es wurde u.a. die Möglichkeit diskutiert, daß durch Zellfusionen infizierter B-Zellen mit Epithelzellen EBV-Genome übertragen werden können (Bayliss & Wolf, 1981). In den letzten Jahren wurde gezeigt, daß die Adsorption an Epithelzellen, die kein CD21 exprimieren über das virale Glykoprotein gH (BXLF2-Protein) vermittelt wird (Molesworth et al., 2000). Für die Aufnahme des Virus in die Zelle werden neben dem eigentlichen Rezeptor außerdem Korezeptoren benötigt. In B-Lymphozyten erfolgt die Penetration durch die Interaktion von MHC-Klasse II-Molekülen mit einem Komplex der viralen Proteine gp42 (BZLF2), gH und gL (BKRF2-Protein) (Li et al., 1995; Molesworth et al., 2000). In Epithelzellen werden keine MHC-Klasse II-Proteine exprimiert. Die Penetration erfolgt ohne Beteiligung des viralen gp42 (Wang et al., 1998). Berichte über EBV-Replikation in Epithelzellen des Oropharynx (Sixbey et al., 1984)

wurden jedoch nicht bestätigt. In mehreren Arbeiten wurde gezeigt, daß die lytische Vermehrung des Virus ausschließlich in mukosalen B-Lymphozyten abläuft (Anagnostopoulos et al., 1995; Karajannis et al., 1997; Tao et al., 1995). Diese Hypothese wird außerdem durch die Beobachtung gestützt, daß es in Patienten mit X-chromosomaler Agammaglobulinämie (XLA), die keine funktionellen, reifen B-Zellen besitzen, nicht zu einer Infektion mit EBV kommt (Faulkner et al., 1999).

Penetration und Uncoating

Nach der Adsorption kommt es zur Aufnahme der Viruspartikel durch polare Endozytose (Carel et al., 1990) und zur Fusion der Vesikelmembran mit der Virushülle. Dabei wird das Viruskapsid und das Tegument in das Cytoplasma freigesetzt (Tanner et al., 1987). Über die Auflösung des Kapsids und den Transport des viralen Genoms in den Zellkern ist nur wenig bekannt. Analog zu anderen DNA-Viren (Dales & Chardonnet, 1973) und im Speziellen anderen Herpesviren (Roizman, 2001) geht man davon aus, daß das Kapsid über das Zytoskelett zum Kern bzw. den Kernporen transportiert wird (Kieff, 2001).

Während das Genom in Viruspartikeln als linearer Doppelstrang vorliegt, kommt es in infizierten Zellen zur Zirkularisation über homologe Rekombination der Genomenden, d.h. die DNA liegt - meist in mehreren Kopien - episomal vor. Außerdem wurden in einzelnen Burkitt-Lymphom-Zelllinien (Delecluse et al., 1993) und lymphoblastoiden Zelllinien (Hurley et al., 1991; Matsuo et al., 1984) in die zelluläre DNA integrierte virale Genome beschrieben.

Assembly und Freisetzung neu gebildeter Virionen

Die Replikation der Virus-DNA während des lytischen Zyklus erfolgt nach dem *rolling-circle*-Mechanismus. Dabei entsteht ein Konkatermer aus mehreren EBV-Genomen. Im Zellkern werden zunächst unreife Partikel aus Kapsidproteinen assembliert. In diese unreifen Kapside wird ein Genomäquivalent DNA eingeschleust und der Doppelstrang geschnitten. Nach der Assoziation mit Tegumentproteinen lagern sich die Partikel an die innere Kernmembran, die die viralen Glykoproteine enthält. Die Membran umgibt die Partikel, die sich im perinukleären Raum sammeln. Wie auch bei anderen Herpesviren wird kontrovers diskutiert, ob die Partikel über das endoplasmatische Retikulum ins Zytoplasma freigesetzt werden und beim Durchtritt durch die Zytoplasma- bzw. Post-

Golgi-Membran ihre endgültige Membran erhalten (*re-envelopment pathway*), oder ob die nukleäre Membran erhalten bleibt und die Virionen in Vesikeln über den Golgi-Apparat aus der Zelle ausgeschleust werden (*luminal pathway*) (Kieff, 2001; Mocarski, 2001; Roizman, 2001).

Latente Infektion und Übergang in den lytischen Zyklus

Nach der lytisch verlaufenden Primärinfektion etabliert EBV eine lebenslange Latenz in ruhenden, nicht aktivierten *memory*-B-Zellen, die das Reservoir des Virus bilden. Es wurde gezeigt, daß in gesunden Trägern 1-50 von 10^6 B-Zellen latent infiziert ist (Miyashita et al., 1995).

Nach der Infektion naiver B-Zellen werden zunächst alle latenten Gene exprimiert, also ein Latenz III-Phänotyp ausgebildet (vgl. Tab. 1), was dazu führt, daß sich die naiven B-Zellen zu proliferierenden Blasten entwickeln. Die virale Expression wird im Folgenden auf EBNA1, LMP1 und LMP2A reduziert und die Blasten durchlaufen in den so genannten Keimzentren der Lymphknoten die Differenzierung zu ruhenden *memory*-B-Zellen, in denen nur LMP2A-mRNA und die nicht-codierenden EBER-Transkripte exprimiert wird. Im Falle einer Teilung dieser B-Zellen wird auch EBNA1-Protein exprimiert, das die Replikation des viralen Episoms und die Verteilung auf die Tochterzellen analog zu den zellulären Chromosomen sicherstellt (Amon & Farrell, 2005).

Bei immunkompetenten Virusträgern findet man im Bereich des Oropharynx immer wieder eine aktive lytische Vermehrung des Virus und auch die Ausschüttung infektiöser Partikel. Wie bereits erwähnt konnte jedoch keine virale Replikation in Epithelzellen nachgewiesen werden, die Virusproduktion erfolgt also in B-Zellen, die sich im Bereich der Mukosa befinden und in denen es zu einer Reaktivierung des Virus kommt. Die genauen Mechanismen dieser Reaktivierung sind unklar. Eine Möglichkeit wäre, daß die Differenzierung von ruhenden *memory*-B-Zellen zu antikörperproduzierenden Plasmazellen und die damit verbundenen zellulären Veränderungen eine lytische Replikation des Virus ermöglichen (Amon & Farrell, 2005).

Für den Übergang von einer Form der Latenz in eine andere bzw. in den lytischen Zyklus werden zwei Modelle (*parallel path* und *serial path*) diskutiert. Beim *parallel path* geht man davon aus, daß Immortalisierung und Latenz unabhängig voneinander etabliert werden können, während das Modell des *serial path* die

Latenz als eine mögliche Folge der Immortalisierung sieht. Keines der beiden Modelle konnte jedoch bisher in allen Einzelheiten experimentell schlüssig bestätigt werden (Rowe, 1999). *In vivo* treten weniger als 2% der latent infizierten B-Zellen in den lytischen Zyklus ein (Decker et al., 1996). Die Induktion der viralen Genexpression erfolgt dabei kaskadenförmig in drei Stufen.

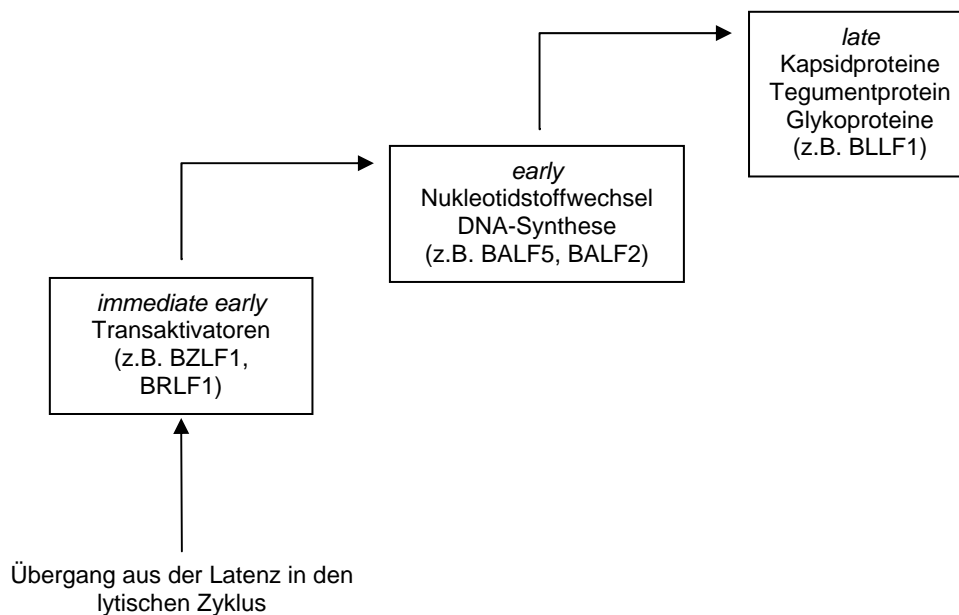


Abbildung .2: Kaskadenförmige Induktion der viralen Genexpression während des lytischen Zyklus.

Zunächst werden Transaktivatoren exprimiert, die als *immediate-early* Gene bezeichnet werden. Besonders zu erwähnen ist dabei das BZLF1-Protein (Z-Transaktivator). Die Expression von BZLF1 genügt, um den lytischen Zyklus in Zellkultur zu induzieren (Rooney et al., 1989). Das BZLF1-Protein reguliert sowohl seine eigene als auch die Expression der anderen *immediate-early* und mehrerer *early* Gene positiv. Im Folgenden werden ca. 30 *early* Proteine exprimiert, zu denen die virale DNA-Polymerase (BALF5-Protein), DNA-bindenden Proteine (z.B. BALF2-Protein), sowie weitere Enzyme der DNA-Replikation und des Nukleotidstoffwechsels gehören. In der letzten Phase des lytischen Zyklus werden die ca. 40 *late* Gene exprimiert. Sie codieren in erster Linie für Strukturproteine des Kapsids und Teguments und für die in der Virusmembran eingelagerten Glykoproteine (z.B. gp350/220, BLLF1-Protein)

Je nach Differenzierungsstadium und Zelltyp findet man bei verschiedenen EBV-assoziierten Tumoren bzw. latent infizierten B-Zellen unterschiedliche Expressionsmuster latenter Gene.

In der Literatur wurde die Einteilung in verschiedene Latenzmuster immer wieder modifiziert (Rowe et al., 1992; Thorley-Lawson et al., 1996; Young et al., 2000). In Tabelle 1 ist das Schema nach Young et. al dargestellt.

Bezeichnung	virale Transkripte	Zelltyp	zelluläre Expression
Lat I	EBNA1 EBER1, 2	BL <i>in vivo</i> frühe BL-Passagen	CD10, CD77 keine Aktivierungsmarker keine Adhäsionsmoleküle
Lat II	EBNA1 LMP1, 2 EBER1, 2 BamHI-A-Transkripte	NPC HD T-Zell-Lymphom	
Lat III	EBNA1-3, EBNA-LP LMP1, 2 EBER1, 2 BamHI-A-Transkripte	LCL PTLD späte BL-Passagen	Aktivierungsmarker CD23, CD30, CD39, CD70 Adhäsionsmoleküle ICAM1, CD11a/18, CD58

Tabelle 1: Phänotyp und Eigenschaften latent infizierter Zellen *in vivo* und *in vitro* nach Young et al., 2000. BL=Burkitt-Lymphom, NPC= Nasopharynx-Karzinom, HD= Hodgkin's Disease, LCL= Lymphoblastoide Zelllinien, PTLD= *Post-transplant lymphoproliferative disease*

Wie in Tabelle 1 dargestellt kann sich das Expressionmuster von Burkitt-Lymphom-Zellen nach *in vitro*-Passagen von Latenztyp I zu Latenztyp III verändern (Gregory et al., 1990). Auch in Biopsiematerial aus Burkitt-Lymphomen konnte in einigen Zellen Expression von EBNA2 und LMP1 nachgewiesen werden (Niedobitek et al., 1995). Es ist davon auszugehen, daß die Situation in Tumor-Zelllinien nicht unbedingt auf Tumoren *in vivo* übertragbar ist und sich auch *in vivo* Expressionsmuster dynamisch verändern können (Young et al., 2000). Bei der Evaluierung von Expressionsanalysen muß außerdem berücksichtigt werden, daß in der Regel nicht Einzelzellen, sondern ein Gemisch aus EBV-positiven,

wahrscheinlich in ihrer viralen Expression nicht einheitlichen Zellen als Ausgangsmaterial dient.

Transformation

In vitro können primäre humane B-Lymphozyten mit Epstein-Barr Virus infiziert werden. In diesen Zellen kommt es nicht zur Produktion von infektiösen Partikeln, vielmehr werden alle latenten Gene exprimiert, also ein Latenz III-Phänotyp ausgebildet. Die Beobachtung, daß diese Zellen kontinuierlich proliferieren und so genannte lymphoblastoide Zelllinien (LCL) ausbilden, zeigt das onkogene Potential des Epstein-Barr Virus. B-Lymphozyten von EBV-Trägern können in Kultur spontan einen immortalisierten Phänotyp zeigen, wenn die immunologische Kontrolle durch T-Zellen z. B. durch Zugabe von Cyclosporin A verhindert wird. Auch in diesen Zellen findet man einen Latenz III-Phänotyp, allerdings kommt es außerdem in einem Teil der Zellen zu aktiver Virusproduktion. Das Zusammenspiel verschiedener latenter Proteine (EBNA1, EBNA2, EBNA3A, EBNA3C, LMP1) bewirkt eine Proliferation der transformierten B-Zellen und verhindert den Zelltod durch Apoptose. Die Funktionen der einzelnen viralen Proteine sollen im Folgenden kurz dargestellt werden.

Das EBNA1-Protein ist für die Aufrechterhaltung des immortalisierten Zustands essentiell. Als Transaktivator induziert es die Expression der latenten Gene und reguliert seine eigene Synthese. Außerdem bindet das EBNA1-Protein sequenzspezifisch an den Startpunkt der episomalen Replikation und sorgt neben der Initiation der viralen Replikation auch für die Segregation der Virusgenome während der zellulären Mitose. Das EBNA2-Protein ist maßgeblich an der Etablierung der Latenz und des immortalisierten Phänotyps beteiligt. Es reguliert als Transaktivator die Expression viraler (LMP1 und LMP2) und zellulärer Gene (z. B. Cytokine, Wachstumsfaktoren, Proto-Onkogene), wobei es nicht direkt, sondern über zelluläre Faktoren an die DNA bindet. Die EBNA3-Proteine modulieren EBNA2-abhängige Prozesse und greifen regulatorisch in verschiedene Transkriptionsprozesse ein. Die genaue Wirkungsweise dieser Proteine ist jedoch unklar. Das Membranprotein LMP1 wirkt wie ein konstitutiv aktivierter Rezeptor und induziert über Signalkaskaden NF κ B und in der Folge alle Promotoren, die durch diesen Transkriptionsfaktor beeinflußt werden. Unter anderem wird so die Apoptose von EBV-infizierten Lymphozyten verhindert.

1.2.4 Immunologische Kontrolle von EBV

In der Regel verläuft bei immunkompetenten Patienten die Primärinfektion mit EBV asymptomatisch oder - im Falle der Infektiösen Mononukleose - selbstlimitierend. Das Immunsystem ist in der Lage durch das Zusammenspiel humoraler und zellulärer Komponenten die lytische Vermehrung von EBV zu kontrollieren. Reaktivierungen verlaufen bei Immunkompetenten in der Regel asymptomatisch.

Humorale Immunantwort

Während der Infektiösen Mononukleose kommt es zu einer polyklonalen Aktivierung von B-Zellen, was zu einem transienten Anstieg von Autoantikörpern und den so genannten heterophilen Immunglobulinen führt (Henle & Henle, 1981). Sie dienen als erster diagnostischer Hinweis auf eine Infektiöse Mononukleose. Die spezifische humorale Immunantwort verläuft bei asymptomatischer Primärinfektion und Infektiöser Mononukleose vergleichbar ab. Zunächst werden IgM-Antikörper gegen das Viruskapsidantigen (anti-VCA), sowie gegen die *early*-Proteine des lytischen Zyklus (anti-EA) gebildet. Später findet man IgG-Antikörper gegen diese Antigene. Neutralisierende gegen Membranantigene gerichtete Antikörper treten erst spät im Krankheitsverlauf auf. Sie verhindern eine weitere Ausbreitung des Virus, spielen jedoch auch bei der antikörperabhängigen zellulären Zytotoxizität (ADCC) eine Rolle. Sie binden an die Membran infizierter B-Zellen und vermitteln über die Interaktion ihres Fc-Teils mit entsprechenden Rezeptoren auf natürlichen Killerzellen die Eliminierung der antikörpermarkierten Zellen (Khyatti et al., 1991). Erst beim Übergang des Virus in den latenten Zustand findet man Antikörper gegen die EBNA-Proteine, denen jedoch trotz der Expression von EBNA1 in asymptomatischen Virusträgern keine Bedeutung bei der Viruskontrolle beigemessen wird (Rickinson, 1996). Bei einer Reaktivierung werden erneut IgM-Antikörper gebildet. Die unterschiedlichen Antikörper-Konstellationen erlauben die serologische Unterscheidung von Primärinfektion, latenter Infektion und Reaktivierung.

Zelluläre Immunantwort

Erste Hinweise, daß das zelluläre Immunsystem eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung von EBV-Infektionen spielt, lieferte die Beobachtung, daß in Lymphozytenkulturen EBV-positiver Spender immortalisierte B-Zellen zunächst auswachsen, dann jedoch wieder verschwinden. Dieses Phänomen wurde als "Regression" bezeichnet (Moss et al., 1978; Rickinson et al., 1979) und wird durch zytotoxische T-Zellen vermittelt.

Während der infektiösen Mononukleose kommt es zu einer starken Expansion spezifischer, gegen lytische Antigene gerichteter CD8⁺-T-Zellen auf bis zu 30% der gesamten CD8⁺-T-Zellpopulation (Callan et al., 1996; Maini et al., 2000). Die T-Zell-Antwort gegen latente Antigene ist deutlich schwächer ausgeprägt. Nach Ablauf der primären Infektion kommt es zu einer Reduktion der EBV-spezifischen T-Zellen. In latent infizierten Trägern können lebenslang T-Zellen gegen latente und lytische Antigene nachgewiesen werden. Während der Latenz wird in ruhenden B-Zellen als einziges virales Protein EBNA1 exprimiert. Dieses Protein enthält eine Wiederholungssequenz der Aminosäuren Glycin und Alanin, die den Abbau des Proteins über Proteasomen und somit die Präsentation viraler Peptide auf MHC-Klasse I-Molekülen verhindert (Levitskaya et al., 1997). Latent infizierte B-Zellen können also von CD8⁺-T-Zellen nicht erkannt und eliminiert werden. Kommt es jedoch zur Expression anderer latenter Proteine oder zur Reaktivierung und damit zur Expression lytischer Antigene, erkennen und eliminieren zytotoxische CD8⁺-T-Zellen infizierte Lymphozyten. Sie spielen somit eine wichtige Rolle bei der immunologischen Kontrolle der EBV-Infektion.

Die Rolle CD4⁺-T-Zellen bei der EBV-Infektion ist weniger gut untersucht. In den letzten Jahren wurde gezeigt, daß CD4⁺-T-Zellen während der Primärinfektion nur in sehr geringem Ausmaß expandieren (Maini et al., 2000), diese Zellen jedoch spezifisch auf Stimulation mit EBV-Antigenen reagieren. Ähnlich wie bei CD8⁺-T-Zellen nimmt auch die Zahl der CD4⁺-T-Zellen nach der primären Infektion ab, spezifische T-Zellen bleiben jedoch detektierbar (Amyes et al., 2003).

EBNA1-spezifische CD4⁺-T-Zellen könnten einen neuen Ansatzpunkt für die Immuntherapie von Tumoren, die nur EBNA1 exprimieren und wegen der fehlenden Präsentation auf MHC-Klasse I-Molekülen von CD8⁺-T-Zellen nicht erkannt werden, bilden (Callan et al., 1998).

1.2.5 Pathogenese und Krankheitsbilder

Infektiöse Mononukleose

In mehr als 95% der erwachsenen Bevölkerung sind Antikörper gegen EBV nachweisbar. Die Primärinfektion findet in der Regel im frühen Kindesalter statt und verläuft meist inapparent. Mit steigendem hygienischen Standard (z.B. geringere Anzahl Kinder pro Familie, verbesserte Wohnbedingungen) verzögert sich der Zeitpunkt der Primärinfektion. Findet diese im Jugend- oder jungen Erwachsenenalter statt kommt es in ca. 50% der Fälle zum Krankheitsbild der Infektiösen Mononukleose (Henle et al., 1968). Die Krankheit äußert sich zunächst in grippeähnlichen Symptomen wie Fieber, Kopfschmerzen und Müdigkeit. Charakteristisch ist eine generalisierte Lymphknotenschwellung, Tonsillitis und oft auch Splenomegalie. In schweren Fällen kann es zu EBV-assoziierten Hepatitiden, Arthritiden oder Enzephalitiden kommen (Straus et al., 1993). Während der primären Infektion repliziert das Virus im Oropharynx und wird in hohen Titern im Speichel ausgeschieden. Außerdem findet man große Mengen latent infizierter B-Zellen in lymphoiden Organen (Young & Rickinson, 2004). Die Gabe von Aciclovir, das die virale Replikation inhibiert, führt zwar zu verminderter Virusausschüttung im Oropharynx, hat jedoch keinen Einfluß auf die Viruslast im peripheren Blut, also auf latent infizierte B-Zellen. Auch der klinische Verlauf wird trotz Reduktion der lytischen Vermehrung von antiviralen Therapien nicht beeinflusst. Die Symptome der Infektiösen Mononukleose sind also nicht auf die Virusreplikation, sondern vielmehr auf die Immunreaktion des Patienten zurückzuführen. Aufgrund der außergewöhnlich starken Expansion CD8⁺-T-Zellen kommt es zur Ausschüttung großer Mengen von proinflammatorischen Cytokinen. Die Infektion verläuft in der Regel selbstlimitierend.

Warum die Primärinfektion im Kindesalter meist asymptomatisch verläuft ist nicht eindeutig geklärt.

Chronisch-aktive Infektion

In seltenen Fällen kann es nach einer Infektiösen Mononukleose zu monate- oder jahrelangem Anhalten der Symptome kommen, was als chronisch-aktive Infektion bezeichnet wird. Bereits 1988 wurden 3 Kriterien für die chronisch aktive EBV-Infektion (CAEBV) definiert: (1) schwere Symptome über einen Zeitraum von mindestens 6 Monaten nach der Primärinfektion mit auffällig veränderten

Antikörpertitern, (2) histologische Bestätigung einer Organbeteiligung (z.B. Splenomegalie, persistierende Hepatitis, interstitielle Pneumonie), (3) erhöhte Viruslast in den betroffenen Organen (Straus, 1988). Trotzdem finden sich in der Literatur immer wieder Fallberichte, in denen von CAEBV gesprochen wird, die jedoch nicht alle Kriterien, die für diese Diagnose essentiell sind, erfüllen. Die Heterogenität der beschriebenen Fälle macht eine klare Aussage über Ursachen und Folgen chronisch-aktiver EBV-Infektionen schwierig.

X-linked lymphoproliferative syndrome (XLP) bei Primärinfektion mit EBV

Schwerwiegende Komplikationen bei der Primärinfektion mit EBV treten familiär gehäuft bei Männern auf und sind mit Gendefekten auf dem X-Chromosom korreliert. Dieses so genannte XLP-Syndrom (*X-linked lymphoproliferative syndrome*), auch als Duncan-Syndrom bezeichnet, führt in bis zu 75% der Fälle zum Tod. Überlebende Patienten haben ein stark erhöhtes Risiko maligne Lymphome zu entwickeln (Purtilo, 1991). Durch die Mutation eines Gens auf dem X-Chromosom (Xq25-q27) ist die geregelte Interaktion spezifischer B- und T-Zellen gestört. Die humorale Immunantwort gegen EBV bleibt aus, statt EBV-spezifischer T-Zellen treten alloreaktive T-Zellen auf, die die Leber und andere Organe infiltrieren, zur Lebernekrose bzw. zum Versagen anderer Organe führen und so für den Großteil der Todesfälle verantwortlich sind (Sullivan & Woda, 1989).

Orale Haarleukoplakie

Bei Patienten, die mit dem humanen Immundefizienzvirus (HIV) infiziert sind, können an den seitlichen Zungenrändern weißliche Epithelverdickungen auftreten, die als orale Haarleukoplakie (OHL) bezeichnet werden. In den obersten Schichten des Epithels kann dabei EBV-Replikation nachgewiesen werden. Die Läsionen sind mit Aciclovir behandelbar. Interessanterweise ist diese Erkrankung relativ spezifisch für HIV-Infizierte und tritt nur sehr selten bei Patienten mit anderen Immundefiziten auf (Epstein et al., 1991).

EBV-assoziierte Tumorerkrankungen

EBV wurde als erstes humanpathogenes Virus mit Tumoren in Verbindung gebracht. Bereits in den 1960er Jahren konnte EBV als Mitverursacher für Burkitt-Lymphome identifiziert werden (Epstein et al., 1964; Henle & Henle, 1966).

Burkitt-Lymphom

Das Burkitt-Lymphom ist ein schnell wachsender, monoklonaler Tumor in B-Zellen, der v.a. in der Kieferregion, aber auch im Gehirn oder den Ovarien auftreten kann. Neben der sporadischen Form, bei der EBV nur in 10-25% der Tumoren auftritt, findet man in Zentralafrika und Neu-Guinea die endemische Form, die in mehr als 90% der Fälle mit EBV assoziiert ist (Lenoir, 1994). Diese Form des Burkitt-Lymphoms tritt bevorzugt bei Kindern auf und steht in engem Zusammenhang mit dem Verbreitungsgebiet des Malariaerregers *Plasmodium falciparum*. Die Tumoren weisen charakteristische Chromosomentranslokationen auf, die das Proto-Onkogen c-myc unter die Kontrolle von Immunglobulin-Promotoren stellen und so zu einer verstärkten Expression von c-myc führen. Es wird angenommen, daß die wiederholte Infektion mit Malaria zu einer B-Zell-Stimulierung führt. Durch die erhöhte Anzahl EBV-infizierter, proliferierender B-Zellen steigt die Wahrscheinlichkeit auf Chromosomentranslokationen in diesen Zellen (Lyons & Liebowitz, 1998).

Nasopharynxkarzinom (NPC)

Das Nasopharynxkarzinom ist ein aggressiver, stark metastasierender Tumor der Epithelzellen des Nasen-Rachen-Raumes. In nahezu allen Fällen von undifferenziertem NPC läßt sich EBV in Tumorzellen nachweisen (Levine, 1991). Wie bereits erwähnt ist unklar auf welche Weise das Virus in die CD21 nur schwach exprimierenden Epithelzellen gelangen kann. Während diese Erkrankung in den meisten Teilen der Erde selten ist, stellt sie in Südostasien, besonders in Kanton, Hong Kong und Taiwan, eine der häufigsten Tumorerkrankungen dar. Diese geographische Häufung wird mit bestimmten HLA-Konstellationen in der chinesischen Bevölkerung und Umwelteinflüssen, wie z. B. dem Verzehr von gesalzenem Fisch und dem Kontakt mit bestimmten Kräutern und Gewürzen in Verbindung gebracht (Henderson et al., 1976; Simons et al., 1976). Die entscheidende Rolle als Karzinogene spielen dabei wahrscheinlich die enthaltenen Nitrosamine und Phorbolester-ähnlichen Substanzen, die zu einer

EBV-Aktivierung führen können (Poirier et al., 1989). NPC-Zellen exprimieren und prozessieren virale Antigene und werden von EBV-spezifischen cytotoxischen T-Zellen effektiv erkannt. Trotzdem kommt es nicht zu einer Lyse der infizierten Zellen. Als mögliche Ursache für diesen *immune-escape* wird die Expression des viralen IL-10-Homologs vIL-10 angesehen (Bejarano & Masucci, 1998; Huang et al., 1999).

Morbus Hodgkin

Unter dem Begriff Morbus Hodgkin wird eine heterogene Gruppe von lymphoproliferativen Erkrankungen zusammengefasst. Histologisch sind in befallenen Lymphknoten so genannte Hodgkin- und Reed-Sternberg-Zellen nachweisbar. In diesen maligne transformierten Zellen sind je nach Subtyp des Tumors in 10-95% der Fälle EBV-Genome detektierbar (Chapman & Rickinson, 1998). Sie machen jedoch nur einen sehr geringen Anteil des Tumors aus, dessen Masse zu über 90% aus infiltrierenden, nicht transformierten Zellen besteht. In der westlichen Welt ist Morbus Hodgkin die häufigste Lymphom-Erkrankung in Jugendlichen und jungen Erwachsenen.

Assoziation mit anderen Tumoren

Neben den beschriebenen Tumoren, deren Assoziation mit EBV unbestritten ist, wurden in den letzten Jahren auch andere Tumorerkrankungen mit EBV in Verbindung gebracht. Eine ursächliche Beteiligung von EBV an Magenkarzinomen (Shibata & Weiss, 1992; Tokunaga et al., 1993), sowie Karzinomen der Leber und der Brust (Bonnet et al., 1999; Sugawara et al., 1999) wird jedoch nach wie vor kontrovers diskutiert (Thompson & Kurzrock, 2004).

EBV-assoziierte Tumoren bei HIV-Patienten

HIV-infizierte Patienten haben ein erhöhtes Risiko an einem EBV-assoziierten B-Zell-Lymphom zu erkranken. Dabei handelt es sich im Frühstadium der HIV-Infektion um Burkitt-Lymphom-ähnliche Tumoren bzw. im Endstadium von AIDS um immunoblastische Lymphome (Pedersen et al., 1991).

1.2.6 Epstein-Barr Virus und Immunsuppression

Die Balance zwischen viraler Aktivität und dem Immunsystem spielt eine wichtige Rolle bei der Etablierung und Persistenz einer latenten Infektion. Geringe Mengen latent infizierter *memory*-B-Zellen garantieren das Überleben des Virus ohne jedoch den Träger zu schädigen. Sobald latent infizierte Zellen vermehrt latente Proteine exprimieren, was zu unkontrollierter Vermehrung und Tumorentstehung führen könnte, werden diese Zellen immunologisch erkannt und durch zytotoxische T-Zellen eliminiert. In immunkompetenten Trägern werden zwar regelmäßig infektiöse Partikel gebildet, diese Reaktivierungen verlaufen jedoch asymptomatisch und selbstlimitierend, da gegen lytische Antigene gerichtete cytotoxische T-Zellen eine weitere Ausbreitung des Virus verhindern.

In immunsupprimierten Patienten, besonders nach Organtransplantationen, ist diese Balance durch die Suppression der T-Zell-Antwort gestört. Wie auch andere Herpesviren (vgl. Abschnitt 1.3.4) kann EBV bei Patienten nach Organ- bzw. Stammzelltransplantation schwerwiegende Komplikationen hervorrufen.

In einigen Prozent der Fälle kommt es in den ersten Monaten nach Transplantation zu lymphoproliferativen Erkrankungen, die als PTLD (*posttransplantation lymphoproliferative disease*) bezeichnet werden und mit einer hohen Morbidität und Mortalität assoziiert sind. Die Assoziation besonders von PTLD in den ersten Monaten nach Transplantation mit Epstein-Barr Virus konnte in vielen Arbeiten gezeigt werden (Patel, 2001). Eine einheitliche Definition von PTLD ist schwierig, da unter diesem Begriff eine Vielzahl von Erkrankungen, die alle durch eine Proliferation von B-Zellen gekennzeichnet sind, zusammengefaßt wird. Das Spektrum reicht dabei von Mononukleose-ähnlichen Krankheitsbildern, polyklonaler lymphoider Hyperplasie bis zu monoklonalen Tumoren, also B-Zell-Lymphomen. In der Regel wird in der Literatur jedoch - falls nicht anders angegeben- nur das Krankheitsbild monoklonaler Lymphome als PTLD bezeichnet (Loren et al., 2003). Bei der Evaluierung von Studien an PTLD-Patienten sollte jedoch auf die Definition im Rahmen der jeweiligen Arbeit geachtet werden.

Die klinischen Manifestationen von PTLD können sehr vielfältig sein, was eine rasche, eindeutige Diagnose erschwert. Unspezifische Symptome wie z. B. Fieber, Schmerzen, Gewichtsverlust und Dysfunktionen des transplantierten Organs können ein Hinweis auf PTLD sein.

Besonders problematisch ist dabei die Tatsache, daß Funktionsstörungen des Transplantats auch als Abstoßungsreaktion gedeutet werden können und in diesem Fall die Immunsuppression erhöht wird. Handelt es sich jedoch nicht um eine Abstoßung, sondern eine PTLD, führt die verstärkte Immunsuppression zur Progression der Erkrankung. Im Fall einer PTLD wird in der Regel die Immunsuppression drastisch reduziert, wobei dann wiederum die Gefahr von Abstoßungsreaktionen besteht. Eine eindeutige Diagnose liefert in der Regel eine Biopsie des betroffenen Gewebes und der Nachweis von EBV durch Immunhistochemie oder PCR in den Lymphomzellen.

Der Behandlungserfolg bei PTLD hängt in großem Maße vom Zeitpunkt der Diagnose ab. Voll ausgebildete Lymphome sind nur schwer therapierbar. Eine Früherkennung der Erkrankung und auch die Definition von diagnostischen Markern, mit denen im Einzelfall Hochrisikopatienten identifiziert werden können, sind essentiell.

In der Regel wird dies durch die regelmäßige Quantifizierung von EBV-DNA im peripheren Blut angestrebt. Die Ergebnisse einzelner Studien unterscheiden sich jedoch stark in ihrer Aussagefähigkeit. Unterschiede im Ausgangsmaterial (Serum, PBL oder Vollblut), willkürlich gewählte Werte für "hohe" oder "erhöhte" Viruslast und die sehr heterogenen Patientenkollektive machen einen Vergleich verschiedener Studien schwierig. Bislang konnte kein einheitlicher Grenzwert für die Viruslast definiert werden, der als prädiktiver Marker für PTLD dienen könnte. Eine Zusammenfassung dieser Problematik wurde vor einigen Jahren publiziert (Green & Webber, 2002). In den letzten Jahren wurden zusätzliche Marker in Kombination mit der Bestimmung der Viruslast untersucht. Allerdings konnten sich serologische Marker (Carpentier et al., 2003), T-Zell-Reaktivitäten (Clave et al., 2004), Interleukin-10-Serumlevel (Muti et al., 2003), und die Analyse einzelner mRNA-Spezies (Qu et al., 2000; Vajro et al., 2000) bisher nicht als einheitlicher Standard durchsetzen. Vor allem bei immunologischen Methoden ist die Durchführbarkeit in der Routine-Diagnostik häufig durch den großen Arbeitsaufwand und die Einschränkungen, die sich durch HLA-Restriktionen ergeben, erschwert.

Neben der Reduktion der Immunsuppression wurde die Anwendung von antiviralen Medikamenten wie Aciclovir und Ganciclovir an kleineren Patientenkollektiven erprobt, meist jedoch in Verbindung mit anderen

therapeutischen Maßnahmen, so daß eine Evaluierung der Effizienz von antiviralen Substanzen schwierig ist. Allerdings muß berücksichtigt werden, daß die antivirale Therapie bei latent infizierten Zellen nicht greift (Colby et al., 1980).

Auch andere alternative Therapiekonzepte werden zur Zeit getestet. Da die meisten PTLD von CD20⁺ B-Zellen ausgehen, kann der Einsatz von monoklonalen anti-CD20-Antikörpern (Rituximab) zu einer Regression des Tumors führen (Jenkins et al., 2002). Auch anti-IL-6-Antikörper wurden in einer Studie erfolgreich zur Behandlung von PTLD eingesetzt. IL-6 ist ein Wachstumsfaktor für proliferierende B-Zellen und tritt bei Patienten mit PTLD in erhöhten Konzentrationen auf (Haddad et al., 2001).

Da in der hier vorgestellten Arbeit unter anderem ein Patientenkollektiv nach Nierentransplantation untersucht wurde, wird hier - als Beispiel für die Transplantation solider Organe - ebenfalls auf Patienten nach Nierentransplantation eingegangen.

In ca. 1% der Fälle kommt es bei Erwachsenen nach Nierentransplantation zu einer PTLD. Die Erkrankung tritt durchschnittlich 6 Monate nach Transplantation auf. Die Inzidenz von PTLD kann jedoch in Hochrisiko-Patientengruppen deutlich höher sein. Risikofaktoren sind dabei zum einen die Intensität der Immunsuppression zum anderen der EBV-Serostatus des Empfängers. Eine EBV-Primärinfektion nach Transplantation, wie sie z. B. bei Kindern, die vor der Transplantation keinen Kontakt mit EBV hatten auftritt, erhöht das Risiko eine PTLD zu entwickeln erheblich (Loren et al., 2003).

Häufiger als bei Nierentransplantationen kommt es nach Stammzelltransplantation im Rahmen der Therapie maligner Erkrankungen des blutbildenden Systems zu EBV-assoziierten lymphoproliferativen Erkrankungen (EBV-PTLD). Generell liegt die Inzidenz solcher Fälle bei etwa 2%, allerdings können bestimmte Faktoren, wie z. B. Stammzellen von nicht-verwandten oder nicht vollständig HLA-kompatiblen Spendern, T-Zell-depletierte Transplantate und intensive Immunsuppression zur Behandlung einer *Graft-versus-Host-Disease* (GvHD), das Risiko für eine PTLD erheblich vergrößern (Curtis et al., 1999). In Hochrisikogruppen kann die Inzidenz von PTLD auf über 20% steigen (Shapiro et al., 1988). Bei allogener Stammzelltransplantation geht die PTLD in den meisten Fällen von transfundierten Donor-Zellen aus. Dies eröffnet bei diesen Patienten eine weitere Therapieoption, die für Patienten nach Transplantation solider Organe nicht zur

Verfügung steht. Man geht davon aus, daß Lymphozyten des Donors in der Lage sind, die ebenfalls vom Spender stammenden infizierten B-Zellen zu erkennen und zu eliminieren. Erste Versuche wurden mit nicht vorselektionierten Spender-Lymphozyten durchgeführt, was zwar zur Regression des Tumors führte, jedoch mit schweren Komplikationen aufgrund von GvHD verbunden war (Papadopoulos et al., 1994). In den letzten Jahren wurde jedoch erfolgreich der Transfer von T-Zellen oder angereicherten EBV-spezifischen cytotoxischen T-Zellen (CTL) des Spenders in den Empfänger zur Behandlung von PTLD eingesetzt (Burns & Crawford, 2004; Davis & Moss, 2004).

Weitere klinische Konsequenzen einer erhöhten EBV-Aktivität, wie sie bei Patienten unter Immunsuppression zu erwarten ist, sind unklar. Fieber, Transaminasenerhöhungen und Verschlechterung der Transplantatfunktion wurden unter Reaktivierungen beobachtet. Ein Kausalzusammenhang konnte jedoch nicht gesichert werden (Kaden et al., 1998). Eine Assoziation von EBV-Reaktivierung und CMV-Infektion wurde diskutiert (Hornef et al., 1995), ebenso ein Zusammenhang zwischen EBV-Aktivität und akuten Abstoßungsreaktionen (Trpkov et al., 1997).

1.3 Grundlagen der Organtransplantation

Ein Schwerpunkt dieser Arbeit war die Charakterisierung der Epstein-Barr-viralen Aktivität bei Patienten nach Organtransplantation. Im Folgenden sollen deshalb kurz Grundlagen zu Nieren- und Stammzelltransplantation, Wirkmechanismen verschiedener immunsuppressiver Medikamente und die Rolle von Infektionen unter Immunsuppression dargestellt werden.

1.3.1 Nierentransplantation (NTx)

In Deutschland werden pro Jahr ca. 2300 Nierentransplantationen - in den meisten Fällen aufgrund von chronischem terminalen Nierenversagen - durchgeführt.

Bei der Auswahl eines Spenderorgans wird auf eine möglichst gute Übereinstimmung des HLA-Systems von Spender und Empfänger geachtet. Grundsätzlich ist eine vollständige HLA-Übereinstimmung jedoch nicht notwendig. Da die Zahl der zu Verfügung stehenden Spenderorgane bei weitem nicht ausreicht um den Bedarf an Transplantationen zu decken, stieg in den letzten Jahren der Anteil von Lebendspenden stetig an. Es wurde gezeigt, daß Lebendspenden auch bei schlechterer HLA-Kompatibilität - also bei Nichtverwandten - die langfristigen Patienten- und Transplantatüberlebenschancen im Vergleich zur postmortalen Transplantation erheblich verbessern (Terasaki et al., 1995). Dies ist in erster Linie auf die verkürzte Ischämiezeiten bei Lebendspenden und die damit verringerten Ischämie-Perfusionsschäden zurückzuführen. In Deutschland ist die Lebendspende gemäß §8 des Transplantationsgesetzes nur für Verwandte ersten oder zweiten Grades, sowie für Ehegatten und Personen, die dem Empfänger "...in besonderer persönlicher Verbundenheit offenkundig nahe stehen...", also auch unverheirateten Partnern, zulässig. Um die Gefahr des Organhandels zu minimieren, werden Lebendspenden von einer Kommission geprüft.

In den letzten Jahren hat die Modifikation bewährter Immunsuppressiva sowie die Zulassung neuer Präparate mit unterschiedlichen Wirkmechanismen zu einer enormen Verringerung früher Abstoßungsereignisse bei Nierentransplantationen geführt (Hariharan et al., 2000) und das Transplantatüberleben im ersten Jahr nach Transplantation auf über 95% steigen lassen (Sayegh & Carpenter, 2004).

Allerdings stiegen mit der effektiveren Immunsuppression die Komplikationen aufgrund opportunistischer Infektionen und Nebenwirkungen der langfristigen Immunsuppression wie z.B. Tumorerkrankungen und Herz-Kreislauf-Probleme (Vincenti, 2003).

In 65% der Fälle wird die Immunsuppression mit einer Antikörper-basierten Induktionstherapie gestartet. Die weitere Immunsuppression erfolgt in der Regel als Dreifach-Kombination aus einem Calcineurin-Inhibitor, Mycophenolat-Mofetil und Kortikosteroiden (Kaufman et al., 2004). Nach 6-9 Monaten sollte ein Steroidentzug angestrebt werden, um die Gefahr der Überimmunsuppression zu vermeiden und kardiovaskuläre Risikofaktoren zu senken.

1.3.2 Allogene Stammzelltransplantation (SZT)

Bei der allogenen Transplantation von Knochenmark oder Stammzellen wird das meist durch eine Tumorerkrankung gestörte hämatopoetische System eines Patienten durch das gesunde hämatopoetische System eines geeigneten Spenders ersetzt. In Deutschland werden pro Jahr ca. 1400 allogene Stammzelltransplantationen durchgeführt.

Dem Spender werden hämatopoetische Stammzellen entweder aus dem Knochenmark entnommen oder mittels Leukapherese aus dem peripheren Blut gewonnen. Im zweiten Fall ist eine vorherige Behandlung mit dem Wachstumsfaktor G-CSF (*granulocyte colony stimulating factor*) nötig, um ausreichend Stammzellen im peripheren Blut anzureichern. Die Entnahme von blutbildenden Zellen ist für den Spender risikoarm, es kommt sehr schnell zu einer Regeneration. In den letzten Jahren nahm der Anteil von Transplantationen peripherer Stammzellen stark zu. Die eigentliche Transplantation erfolgt durch Infusion der Spender-Zellen in den Blutkreislauf des Empfängers. Die Stammzellen siedeln sich dann im gesamten Knochenmarkstroma des Empfängers an.

Spender der ersten Wahl für eine allogene Transplantation sind HLA-identische Familienangehörige, z. B. Geschwister, die mit 25% Wahrscheinlichkeit als Spender in Frage kommen. Bei der Suche nach HLA-identischen unverwandten Spendern ist v.a. die Übereinstimmung auf dem HLA-A, HLA-B und HLA-DR-Locus relevant, während eine Übereinstimmung auf dem HLA-C-Locus nicht zwingend erforderlich ist. Die DNA-Subtypisierung ermöglicht es die HLA-Identität

eines potentiellen Fremdspenders zuverlässiger und genauer zu bestimmen. Sollte kein HLA-identischer Spender gefunden werden besteht die Möglichkeit der Transplantation HLA-haploidentischer Stammzellen. Diese können von Eltern, Kindern oder mit 50% Wahrscheinlichkeit von Geschwistern stammen. Dabei teilt der Patient einen der beiden HLA-Haplotypen mit dem Spender, während der andere in der Regel different ist. In den letzten Jahren ist es gelungen, solche Transplantationen erfolgreich durchzuführen. Für das Anwachsen eines haploiden Transplantates ist eine 10-fach höhere Menge an Stammzellen erforderlich. Dies ist durch mehrfache Mobilisierung von peripheren Stammzellen durch die Gabe von G-CSF möglich. Außerdem ist eine hocheffiziente Depletion von T-Zellen aus dem Transplantat erforderlich, da sonst eine fulminante *Graft-versus-Host-Disease* (s.u.) auftritt. Auch die Konditionierung des Empfängers wird in ihrer immunsuppressiven Wirkung maximiert (Aversa et al., 1994). Da bei diesem Vorgehen die Immunsuppression besonders radikal sein muß und außerdem das Transplantat nur sehr wenig T-Zellen enthalten darf, ist die HLA-haploidentische Transplantation mit einer erhöhten Anfälligkeit der Patienten für Virusinfektionen und damit mit einer hohen transplantationsassoziierten Mortalität verbunden. Bessere Prognosen bei HLA-haploidentischen Transplantationen haben Kinder, da sich bei ihnen wahrscheinlich aufgrund der noch besser erhaltenen Thymusfunktion die T-Zellfunktion deutlich schneller als bei erwachsenen Empfängern regeneriert.

Da mit den hämatopoetischen Stammzellen auch das Immunsystem des Spenders übertragen wird, kommt es nach der Transplantation zur Manifestation der *Graft-versus-Host-Disease* (GvHD). Diese wird durch die Spender-T-Zellen vermittelt und richtet sich in erster Linie gegen Haut, Leber und Darm des Empfängers. Man unterscheidet dabei die akute Form der GvHD, die sich ab Beginn der hämatopoetischen Regeneration, meist 4 bis 8 Wochen nach Transplantation manifestiert, und die chronische GvHD, die *per definitionem* nach Tag 100 auftritt. Zur Prophylaxe dieser schwerwiegenden Komplikation wird meist eine Dreifachkombination aus immunsuppressiven Medikamenten (Calcineurin-Inhibitor, Methothrexat und Kortikosteroide) verabreicht. Beim Auftreten schwerer GvHD wird in der Regel mit hochdosierten Steroiden therapiert. Auch eine Dosiserhöhung der Calcineurin-Inhibitoren oder der Einsatz von Mycophenolat-Mofetil ist möglich.

Das transplantierte Immunsystem erfüllt jedoch auch eine wichtige Funktion bei der Eliminierung verbliebener Tumorzellen. Dieser als *Graft-versus-Leukämie* (GvL) bezeichnete Effekt ist für das rezidivfreie Überleben nach allogener Transplantation vor allem für Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie (CML) besonders wichtig. Die Immunsuppression muß also individuell so angepaßt werden, daß der positive GvL-Effekt erhalten bleibt, ohne daß es zur Eskalation der GvHD kommt. Außerdem müssen die Nebenwirkungen der Immunsuppressiva sowie das erhöhte Infektionsrisiko berücksichtigt werden.

Bei allen in dieser Arbeit untersuchten Patienten wurde die Stammzelltransplantation im Rahmen einer Tumorthherapie durchgeführt. Im Folgenden sollen die verschiedenen Grunderkrankungen kurz dargestellt werden.

Die **akute myeloische Leukämie (AML)** ist eine klonale Erkrankung einer frühen myeloischen Vorläuferzelle mit gestörter Ausreifung und unkontrollierter Expansion der leukämischen Zellen im Knochenmark und im peripheren Blut. Man unterscheidet die "de-novo"-AML und die sekundäre AML, die nach einem **myelodysplastischen Syndrom** (maligne, klonale Knochenmarkserkrankung) oder in Folge einer Chemotherapie bei malignen Lymphomen auftritt.

Bei der **chronischen myeloischen Leukämie (CML)** liegt eine maligne Entartung einer pluripotenten Stammzelle zugrunde, die zu einer unkontrollierten Expansion myeloischer Zellen führt, wobei jedoch die Differenzierungsfähigkeit der Zellen erhalten bleibt. Die chronische Phase dieser Erkrankung verläuft über mehrere Jahre asymptomatisch, obwohl im peripheren Blut eine Leukozytose und bei 30% der Patienten eine Thrombozytose nachweisbar ist. Während der wenige Monate dauernden Akzeleration kommt es zur Ausbildung von Blasten im peripheren Blut und im Knochenmark. Die Überlebenszeit in diesem Stadium beträgt nur wenige Monate. Die einzige kurative Therapie der CML ist die allogene Stammzelltransplantation, die bereits während der chronischen Phase durchgeführt werden sollte (Seipelt, 1998).

Die **Osteomyelofibrose (OMF)** kann als eigenständige Krankheit oder als Folge anderer Erkrankungen des hämatopoetischen Systems auftreten. Es kommt zu einer fortschreitenden Verödung des Knochenmarks, wobei das blutbildende Gewebe durch faserreiches Bindegewebe ersetzt wird (Fibrosierung). Im Gegenzug kommt es zu einer Verlagerung der Blutbildung in Milz und Leber, die sich dadurch stark vergrößern. Zunächst kann so die Hämatopoese aufrecht

erhalten werden. Im Verlauf der Erkrankung kommt es jedoch zu einem Mangel an Lymphozyten, Erythrozyten und Thrombozyten. Außerdem werden unreife hämatopoetische Zellen, die normalerweise auf das Knochenmark beschränkt sind, ins periphere Blut ausgeschwemmt. Eine Stammzelltransplantation ist die einzige kurative Behandlungsmöglichkeit. Allerdings ist das Anwachsen des Transplantats durch die Fibrose des Knochenmarks erschwert.

Die **akute lymphatische Leukämie (ALL)** ist eine maligne Erkrankung unreifer lymphatischer Vorläuferzellen. Die unkontrollierte Expansion der lymphatischen Blasten führt zu einer Verdrängung der normalen Blutbildung mit nachfolgender hämatopoetischer Insuffizienz sowie zur Ausschwemmung lymphatischer Blasten in das periphere Blut und zur disseminierten Infiltration anderer Organe.

Unter dem Begriff **Non-Hodgkin-Lymphome (NHL)** werden alle malignen Erkrankungen des lymphatischen Systems mit Ausnahme des Hodgkin-Lymphoms zusammengefasst. Es kann sich dabei um B-, T- oder NK-Zell-Neoplasien handeln, die Lymphozyten in verschiedenen Reifungsstadien betreffen. In der Vergangenheit wurde mehrfach versucht, die einzelnen Erkrankungen zu klassifizieren und zu einer Systematik zu gelangen (National Cancer Institute, 1982; Stansfeld et al., 1988). Eine Zusammenfassung bietet eine Arbeit der WHO, die über 30 Erkrankungen basierend auf zytologischen, histologischen, zytogenetischen und immunologischen Gesichtspunkten als Non-Hodgkin-Lymphome definiert und klassifiziert (Harris et al., 2000).

Eine besonders Form von NHL ist das **Plasmozytom (multiples Myelom [MM])**, das vom Knochenmark ausgeht. Nach der Transformation einer hämatopoetischen Stammzelle kommt es zur autonomen Vermehrung monoklonaler Plasmazellen. Typisch ist eine Anreicherung monoklonaler Immunglobuline und damit eine erhöhte Proteinkonzentration im Blut. Parallel zur vermehrten monoklonalen Immunglobulinbildung wird die Produktion aller anderen Immunglobuline zunehmend eingeschränkt. Es kommt zu einem Antikörpermangelsyndrom, das die Anfälligkeit für virale und bakterielle Infektionen stark erhöht. Durch eine konventionelle Chemotherapie ist lediglich eine Regression des Plasmozytoms zu erreichen. Eine Hochdosis-Chemotherapie mit anschließender Stammzelltransplantation bietet für Patienten unter 60 Jahren eine Heilungschance.

1.3.3 Konditionierung und Immunsuppression

Konditionierung des Empfängers vor Stammzelltransplantation

Die Transplantation von Stammzellen wird u.a. im Rahmen der Therapie verschiedener maligner Erkrankungen des hämatopoetischen Systems durchgeführt. Vor der Transplantation werden die Hämatopoese des Empfängers und damit im Idealfall alle malignen Zellen durch Bestrahlung des ganzen Körpers (*total body irradiation*, TBI) und/oder medikamentös zerstört. Außerdem wird dabei das Immunsystem des Empfängers eliminiert, was für ein Anwachsen (*engraftment*) des Transplantats ohne Abstoßungsreaktion erforderlich ist. Das Schema dieser sogenannten Konditionierung wird - je nach zugrunde liegender Erkrankung - individuell auf den Patienten abgestimmt. Dabei kommt eine Vielzahl verschiedener Substanzklassen zum Einsatz. Alkylierende Agentien (**Cyclophosphamid, Mephaphalan, Busulfan, Carmustin [BCNU]**) alkylieren die DNA und induzieren so Strangbrüche und Quervernetzungen, was zur Inhibierung der DNA-Synthese führt. Auch die Substanzklasse der Topoisomerase-Hemmer wirkt antimetabolisch und zytotoxisch. Diese Medikamente binden an DNA (**Idarubicin**) oder interkalieren in der Doppelhelix (**Amsacrin**). Dadurch wird die Topoisomerase II und so die DNA-Replikation gehemmt. Alternativ kann die DNA-Replikation auch durch synthetische Nukleotide, die zu einem Kettenabbruch bei der DNA-Synthese führen, gehemmt werden (**Fludarabinphosphat, Cytarabin**).

Immunsuppression nach Transplantation

Der Erfolg von Organtransplantationen hängt in erster Linie von einer optimierten Immunsuppression ab. Dabei muß eine Balance zwischen der Unterdrückung von Abstoßungsreaktionen und den unerwünschten Nebenwirkungen sowie der erhöhten Anfälligkeit für Infektionen gefunden werden. Die individuelle Immunsuppression stellt nach wie vor eine der Hauptschwierigkeiten nach Transplantationen dar. Ein grundlegendes Problem aller gebräuchlichen Immunsuppressiva ist die Tatsache, daß die molekularen Angriffspunkte nicht nur in Immunzellen, sondern oft auch in anderen Geweben zu finden sind. Dies führt, besonders bei langfristiger Anwendung, zu teilweise schweren Nebenwirkungen. Für die Zukunft wird es wichtig sein neue, spezifischere Immunsuppressiva, z.B. mittels Struktur- oder Funktionshomologien zu natürlichen Liganden, zu entwickeln (Kahan et al., 2003).

Zur Induktion der Immunsuppression unmittelbar nach der Transplantation von soliden Organen werden in der Regel Antikörper-Präparate verwendet. Die ersten dieser Präparate (z.B. **OKT-3**) basierten auf Antikörpern gegen CD3, die eine Depletion der T-Zellen im Empfänger bewirken. OKT-3 wird heute kaum mehr verwendet. Statt dessen hat sich die Anwendung von polyklonalen Kaninchenantikörpern zur Depletion von T-Zellen etabliert (**Thymoglobulin**). Monoklonale Antikörper gegen CD52 (**Alemtuzumab**), werden eingesetzt, um - ohne Schädigung der hämatopoetischen Vorläuferzellen - Lymphozyten zu depletieren. Ein alternativer Ansatz, der sich immer mehr durchsetzt, sind gentechnisch hergestellte Antikörper gegen den IL-2-Rezeptor (**Basiliximab**, **Daclizumab**) (Helderman et al., 2003). Die Blockade des IL-2-Rezeptors verhindert die autokrine Stimulation von aktivierten T-Zellen. Antikörperpräparate werden auch im Rahmen der Behandlung von *Graft-versus-Host-Disease* bei Patienten nach Stammzelltransplantation eingesetzt.

Bei den meisten Patienten nach Transplantation werden zur Immunsuppression Calcineurin-Inhibitoren eingesetzt (**Cyclosporin A**, **Tacrolimus**). Die Expression von IL-2 wird inhibiert, was dazu führt, daß ruhende T-Lymphozyten in der G₀-Phase des Zellzyklus blockiert werden. Calcineurin-Inhibitoren wirken relativ spezifisch auf T-Lymphozyten, zeigen jedoch in der Langzeitanwendung erhebliche Nebenwirkungen (Kopp & Klotman, 1990; Miller, 2002). Rapamycin (**Sirolimus** bzw. chemisch modifiziert **Everolimus**) greift ebenfalls in die IL-2-Rezeptor-vermittelte Signalkaskade ein. Die immunsuppressive Wirkung von Rapamycin wird durch die fehlende Phosphorylierung von Ribosomen, Initiationsfaktoren und cdk2/CyclinE-Komplexen vermittelt. Es kommt zu einer Störung der Proteinsynthese und zur Blockade des Zellzyklus beim Übergang aus der G₁- in die S-Phase (Schmelzle & Hall, 2000).

Kortikosteroide sind ebenfalls Bestandteil der meisten immunsuppressiven Therapien. In der Regel werden **Prednisolon** oder **Methylprednisolon** (Kaufman et al., 2004) eingesetzt. Die immunsuppressive Wirkung wird durch mehrere Mechanismen vermittelt. In Makrophagen führen sie zu einer Inhibierung der Transkription von IL-1 β , IL-10 und TNF- α , wodurch die antigenstimulierte T-Zellproliferation unterdrückt wird. Außerdem wird die MHC-Expression inhibiert, was zu einer verminderten T-Zell-Aktivierung führt (Neumayer, 2001). In T-Zellen hemmen Glukokortikoide die IL-2-Produktion, außerdem kommt es zu einer

Reduktion der IL-2-Rezeptorbindungsfähigkeit (Northrop et al., 1992). Glukokortikoide inhibieren desweiteren die Aktivierung von Endothelzellen und somit die Expression von Adhäsionsmolekülen, was die gerichtete Migration von Immunzellen in das Transplantat erschwert (Pober & Cotran, 1990). Besonders die Langzeittherapie mit Glukokortikoiden kann zu schwerwiegenden Nebenwirkungen führen (Neumayer, 2001). **Budesonid** wird als lokal in der Darmschleimhaut wirkendes Glukokortikosteroid bei den Darm betreffender *Graft-versus-Host-Disease* eingesetzt. Aufgrund der lokalen Wirkung sind in der Regel weniger Nebenwirkungen als bei systemischen Kortikosteroiden zu beobachten. Inhibitoren der Purinsynthese werden eingesetzt um den *de-novo*-Weg der Guanosin-Nukleotidsynthese zu hemmen. Das bereits 1962 erstmals eingesetzte **Azathioprin** wurde inzwischen durch **Mycophenolat-Mofetil** ersetzt (Kaufman et al., 2004). Da Lymphozyten - im Gegensatz zu anderen Zellarten, die auch den Wiederverwertungsweg der Nukleotidsynthese nutzen können - zur Proliferation auf die Neusynthese von Purinen angewiesen sind, wirken die Inhibitoren der Purinsynthese besonders auf Lymphozyten zytostatisch. Lösliche TNF-Rezeptoren (**Etanercept**) wirken als kompetitive Inhibitoren der Bindung von $\text{TNF}\alpha$ an seine membranständigen Rezeptoren und hemmen so die Aktivität des proinflammatorischen Cytokins $\text{TNF}\alpha$. Ein relativ neues Immunsuppressivum ist das synthetische Sphingolipid **FTY 720**. Der *in vivo* Mechanismus der Immunsuppression durch FTY 720 ist unklar. *In vitro* induziert die Substanz Apoptose von Lymphozyten, hat jedoch keine Wirkung auf Monozyten und Granulozyten. Auch ein Einfluss von FTY 720 auf die Migration von Lymphozyten aus dem Blut in das lymphatische System durch die Modulation der Expression von Adhäsionsmolekülen wird diskutiert (Böhler et al., 1998).

1.3.4 Infektiologische Komplikationen nach Transplantation

Durch die intensive Immunsuppression sind Patienten nach Transplantation besonders anfällig für Infektionskrankheiten. Dabei spielen sowohl Erreger von außen (z. B. Aspergillus), als auch fakultativ pathogene Keime z. B. der Darmflora eine Rolle. Besonders beachtet werden müssen auch Reaktivierungen latent im Körper persistierender Erreger (z. B. Cytomegalovirus, Epstein-Barr Virus). Auf die Rolle von Epstein-Barr Virus bei immunsupprimierten Patienten wurde in Abschnitt 1.2.6 bereits detailliert eingegangen. Im Folgenden sind einige weitere, häufige infektiologische Komplikationen bei Patienten unter Immunsuppression dargestellt.

Infektionen nach Nierentransplantation

Wie bereits erwähnt konnte die Überlebensrate nach Nierentransplantation durch die Optimierung von Immunsuppressiva und die Entwicklung neuer Substanzklassen enorm gesteigert werden. Auch die Inzidenz von Todesfällen aufgrund schwerer Infektionen ging von 50% vor 1980 auf momentan unter 5% zurück (Simon & Levin, 2001).

Das Risiko bestimmter Infektionen folgt einem zeitlichen Muster. Im ersten Monat nach der Transplantation treten häufig nosokomiale Infektionen, vor allem als Folge der Operation auf. Meist handelt es sich dabei um Pneumonien, Infektionen der Harnwege oder der Operationswunde. Diese Komplikationen unterscheiden sich nicht grundlegend von der Situation nach anderen chirurgischen Eingriffen. Die einzige virale, mit der Immunsuppression assoziierte Infektion, die in diesem frühen Stadium häufig auftritt, ist eine Reaktivierung von Herpes simplex Viren (HSV). Opportunistische Infektionen treten gehäuft im ersten halben Jahr nach Transplantation als Folge der Immunsuppression auf. Die häufigste virale Komplikation ist dabei die Infektion mit CMV (Cytomegalovirus), die in bis zu 30% der Transplantatempfänger auftritt, bei 8% der Patienten nach Nierentransplantation kommt es zu CMV-assoziierten Symptomen (Sia & Patel, 2000). Eine Infektion mit BK-Virus und damit verbundene Nephropathien, die häufig zum Funktionsverlust des Transplantats führen, treten bei ca. 5% der Patienten nach Nierentransplantation auf (Patel, 2001). Systemische Pilzinfektionen (z.B. Candida spp., Aspergillus spp., Pneumocystis jiroveci) findet man bei 2%-14% der Patienten (Patel & Paya, 1997). Auch bakterielle Infektionen, besonders der Harnwege treten in den ersten Monaten bei einem Großteil der

Patienten auf. Aufgrund der Immunsuppression treten bei Patienten nach Transplantation auch häufiger als bei Gesunden Infektionen mit *Legionella* spp., *Nocardia* spp. und *Salmonella* spp. auf (Patel, 2001).

Außerdem treten in diesem Zeitraum Reaktivierungen bereits im Körper persistierender Erreger (z.B. *M. tuberculosis*, virale Hepatitis) auf. Nach einem Zeitraum von 6 Monaten spiegeln die Infektionen nach Nierentransplantation im Allgemeinen die Situation in der gesunden Bevölkerung wider. Man findet u.a. Infektionen mit Influenza-Virus, Pneumokokken-Pneumonien und Harnwegsinfekte. Die einzigen opportunistischen Erkrankungen, die auch zu diesem späten Zeitpunkt eine Rolle spielen, sind Reaktivierungen von Varizella-Zoster-Viren (VZV) und die CMV-Retinitis. Eine Ausnahme stellen dabei Patienten dar, bei denen aufgrund wiederholter akuter oder chronischer Abstoßungsreaktionen über einen längeren Zeitraum eine verstärkte Immunsuppression aufrecht erhalten werden muß. Bei diesen Patienten verlängert sich die Phase der opportunistischen Infektionen auf mehr als 6 Monate (Patel, 2001). Das Risiko einer CMV-Infektion bzw. -Reaktivierung kann durch eine prophylaktische Therapie mit Ganciclovir minimiert werden. Allerdings ist zu beachten, daß nach Beendigung der Therapie gehäuft Infektionen auftreten können. Ein besonderes Problem stellen dabei Ganciclovir-resistente Virusvarianten dar, die nach prophylaktischer Therapie vermehrt auftreten. Um dies zu verhindern wird häufig eine präemptive Therapie bevorzugt, d.h. eine Ganciclovir-Therapie wird beim Auftreten subklinischer Anzeichen für eine CMV-Infektion (z.B. Nachweis viraler DNA oder Antigene) begonnen.

Infektionen nach Stammzelltransplantation

Infektiologische Komplikationen spielen bei Patienten nach Stammzelltransplantation eine noch größere Rolle als nach anderen Organtransplantationen. Im Gegensatz zur Transplantation solider Organe ist zwar kein chirurgischer Eingriff nötig, durch die Konditionierung des Empfängers kommt es jedoch zu einem Abfall der Lymphozytenzahlen bis unter die Nachweisgrenze. Während dieser Panzytopenie unmittelbar nach Transplantation kommen Infektionen mit Bakterien und septische Episoden sehr häufig vor. Meist werden diese Infektionen durch grampositive (z. B. Koagulase-negative Staphylokokken, *Corynebacterium* sp., α -hämolytische Streptokokken), seltener durch gramnegative Keime (z.B. *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp., *Pseudomonas* sp.) verursacht. Durch die nach der Konditionierung auftretenden Mukositis werden bakterielle Infektionen zusätzlich begünstigt. Bei rechtzeitiger Gabe entsprechender Antibiotika sind diese Infektionen meist gut behandelbar, so daß eine oft tödlich verlaufende Sepsis relativ selten bleibt. Sehr problematisch sind bei Patienten nach Stammzelltransplantation jedoch systemische Pilzinfektionen, besonders durch *Candida*- oder *Aspergillus*-Spezies. Das Langzeitüberleben von Patienten mit solchen Infektionen liegt nur bei 20% (Hebart & Einsele, 2004). Durch prophylaktische Therapie mit Fluconazol konnte die Inzidenz von *Candida*-Infektionen in den letzten Jahren verringert werden (Nichols, 2003).

Cytomegalovirus-Infektionen sind nach wie vor für einen bedeutenden Teil der Todesfälle nach allogener Stammzelltransplantation verantwortlich. Ohne antivirale Prophylaxe tritt in 60-70% der CMV-seropositiven Patienten bzw. seronegativen Patienten, die Stammzellen von einem CMV-seropositiven Spender erhalten haben, eine CMV-Infektion bzw. -Reaktivierung auf. Klinische Manifestationen sind dabei v.a. Pneumonie, Gastroenteritis, Hepatitis und Retinitis. Obwohl ein Großteil der Patienten zunächst auf Ganciclovir-Therapie und Gabe von CMV-Hyperimmunglobulin gut anspricht, sind die Überlebenschancen bei schweren CMV-assoziierten Symptomen relativ gering (Hebart & Einsele, 2004). In den letzten Jahren konnten durch den Einsatz von Ganciclovir im Rahmen einer prophylaktischen oder präemptiven Therapie CMV-assoziierte Komplikationen in der ersten Phase nach Transplantation weitgehend kontrolliert werden. Allerdings muß berücksichtigt werden, daß nach Ende der Prophylaxe

vermehrt CMV-Infektionen auftreten können, und so nur der Zeitpunkt der Komplikationen verlagert wird (Nichols, 2003).

Durch prophylaktische Therapien mit Aciclovir, Fluconazol und TMP/SMX (Trimethoprim/Sulfamethoxazol) konnte die Inzidenz von Herpes simplex Virus (HSV)-, Candida- und Pneumocystis-Infektionen in den letzten Jahren ebenfalls stark gesenkt werden.

1.4 Ziel der Arbeit

In der Literatur wurden verschiedene virale Expressionsmuster in verschiedenen Tumoren und in ruhenden B-Zellen beschrieben. Allerdings wurden in den meisten Arbeiten nur einzelne Transkripte qualitativ analysiert. Man findet bisher kaum systematische Untersuchungen, die eine quantitative Aussage über die virale Expression bei Gesunden und Personen mit verschiedenen Erkrankungen erlauben.

Das Ziel dieser Arbeit war die Etablierung sensitiver mRNA-Assays zum quantitativen Nachweis verschiedener viraler Transkripte der Latenz und des lytischen Zyklus, die die verschiedenen Stadien der Latenz und den Replikationszyklus des Virus repräsentieren und so eine genaue Charakterisierung der viralen Aktivität ermöglichen.

Da nicht alle ausgewählten Gene gespleißt sind bzw. die Mengenverhältnisse von Spleißvarianten variabel sein können, sollte eine Methode etabliert werden, mit der DNA-freie RNA isoliert werden konnte, so daß eine Unterscheidung von DNA und RNA anhand der Sequenz nicht notwendig war. Auf diese Weise können in Zukunft vergleichbare Systeme auch für andere virale Transkripte unabhängig von Spleißvorgängen entwickelt werden.

Die Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit aller Arbeitsschritte sollte eingehend überprüft werden, um in der Folge ohne aufwendige Kontrolle der einzelnen Patientenproben auch größere Probenmengen im Rahmen von Routine-Anwendungen analysieren zu können. Dabei mußte auch berücksichtigt werden, daß von Immunsupprimierten und Patienten mit schweren EBV-assoziierten Erkrankungen in der Regel nur sehr wenig Blut gewonnen werden kann.

Mit Hilfe der etablierten Systeme sollten die Expressionsmuster verschiedener EBV-positiver Zelllinien charakterisiert werden. Außerdem sollte - in Kombination mit der Detektion EBV-spezifischer Antikörper und der Quantifizierung viraler DNA in Serum und isolierten Lymphozyten - die Expression viraler Gene bei gesunden Trägern und ausgewählten Patienten mit EBV-assoziierten Erkrankungen untersucht werden.

In gesunden Trägern kontrolliert das Immunsystem Reaktivierungen des latenten Virus und verhindert eine unkontrollierte Vermehrung latent infizierter B-Zellen. In immunsupprimierten Patienten nach Transplantationen kommt es jedoch in

einigen Prozent der Fälle zu - oftmals tödlich verlaufenden - EBV-assoziierten Lymphoproliferationen (PTLD, *post-transplant lymphoproliferative disease*). Die Rolle von EBV bei anderen Komplikationen unter Immunsuppression ist unklar.

Im Rahmen einer prospektiven Studie sollte ein Kollektiv von Patienten nach Nieren- bzw. Stammzelltransplantation über einen Zeitraum von 12 Monaten verfolgt werden. Dabei sollten die Viruslast im Serum und in isolierten Lymphozyten, die Expression viraler mRNA und EBV-spezifische Antikörper analysiert werden. Bei ausgewählten Patienten sollte außerdem die EBV-spezifische zelluläre Immunantwort untersucht werden.

Detaillierte Kenntnisse über die virale Aktivität in Immunsupprimierten sind notwendig, um das Zusammenspiel von Virus und Immunsystem unter dem Einfluß immunsuppressiver Medikamente besser zu verstehen und eventuelle EBV-assoziierte Komplikationen früher und spezifischer zu diagnostizieren.

2 Material und Methoden

2.1 Zellkultur

Eukaryontische Zelllinien

In dieser Arbeit wurden die EBV-positiven Zelllinien Raji (Burkitt-Lymphom), Akata (Burkitt-Lymphom), P3-HR₁K (Burkitt-Lymphom), B95-8 (lymphoide Zelllinie aus Krallenaffen), sowie die EBV-negative, ebenfalls aus einem Burkitt-Lymphom abgeleitete Zelllinie BJAB verwendet. Die Zellen wurden in Dulbecco's RPMI 1640-Medium mit 20 g/l NaHCO₃ und 25 mM HEPES kultiviert. Dem Medium wurde 10% hitze-inaktiviertes fötales Kälberserum (FCS), 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin zugesetzt (PAN Biotech, Aidenbach). Je nach Wachstumsrate wurden die Zellen alle 3-5 Tage 1:5 bzw. 1:10 verdünnt.

Ernte der Zellen

Die Ernte der Zellen erfolgte durch Zentrifugation bei 250g für 10 min. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS (684 mM NaCl, 13 mM KCl, 20 mM Na₂HPO₄×12H₂O, 7,3 mM KH₂PO₄) gewaschen und dabei auf gleiche Weise zentrifugiert.

Einfrieren und Auftauen der Zellen

Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet und mit einer Endkonzentration von 5×10⁶ Zellen/ml in fötalem Kälberserum mit 10% DMSO (Sigma, St. Louis, USA) aufgenommen. DMSO verhindert die Bildung von Eiskristallen beim Einfrieren und somit eine Schädigung der Zellen. Je 1 ml der Zellsuspension wurde in Kryogefäße abgefüllt und nach 24h bei -80°C in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Zum Auftauen wurden die Zellen schnell auf 37°C erwärmt, in Kulturmedium überführt und nochmals mit Medium gewaschen.

Induktion des lytischen Zyklus in EBV-positiven Zelllinien

In EBV-positiven Zelllinien kann durch Zugabe von Chemikalien der Übergang aus der Latenz in den lytischen Zyklus induziert werden. Dabei wurden die Zellen für 24-96h mit 3,5 mM Buttersäure und 40 µg/l Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA, Sigma) inkubiert und anschließend geerntet.

2.2 Patientenkollektiv der prospektiven Studie

22 Patienten nach Nierentransplantation und 25 Patienten nach Stammzelltransplantation wurden in einer prospektiven Studie über einen Zeitraum von einem Jahr nach Transplantation verfolgt. Alter, Geschlechtsverteilung, CMV-Status und Überlebensraten sind in Tabelle 2 dargestellt. Als Kontrollkollektiv dienten 4 gesunde Virusträger (Alter 39-56 Jahre, Median 41 Jahre, m/w: 3/1). In regelmäßigen Abständen wurde Blut entnommen und EBV-spezifische Antikörper, die Viruslast in Serum und PBL sowie die Expression viraler mRNAs untersucht. Außerdem wurde bei HLA-B8-positiven Patienten nach Stammzelltransplantation die EBV-spezifische, zelluläre Immunantwort mittels ELISPOT analysiert. Dies war nicht zu allen Zeitpunkten möglich, da in einigen Fällen zu wenig PBL zur Verfügung standen. Die zelluläre Immunantwort bei Nierentransplantierten wurde im Rahmen eines ReForM-C-Projekts von Sascha Barabas an unserem Institut untersucht. Diese Ergebnisse werden in Kapitel 3.4.5 ebenfalls kurz vorgestellt. Weiterführende Angaben zu Grunderkrankungen, Konditionierung und Immunsuppression und finden sich in den Kapiteln 3.4.1 und 5.1.

		NTx	SZT
Anzahl		22	25
Alter (Median)		49 Jahre	48 Jahre
Alter (Bereich)		17-68 Jahre	18-64 Jahre
m/w		16/6	13/12
Überleben nach 1 Jahr		21 (95%)	16 (64%)
CMV E/D	pos/pos	8	7
	neg/neg	5	12
	pos/neg	1	3
	neg/pos	8	3

Tabelle 2: Anzahl, Alter, Geschlecht, Überlebensrate und CMV-Status der Transplantationspatienten (E/D: Empfänger/Donor).

2.3 Serologie

EBV-spezifische Antikörper wurden bei allen Probanden mit zwei verschiedenen Assays analysiert. Der Enzym-Immunoassay (ELISA) der Firma Biotest (Dreieich) detektiert IgM-Antikörper und IgG-Antikörper gegen den early-antigen-Komplex (EA-Proteine), sowie IgG-Antikörper gegen das EBNA1-Protein. Bei diesem Test reagieren die spezifischen Antikörper im Serum mit an die Festphase gekoppelten rekombinanten Antigenen (EA-D-p54, EA-p138 und EBNA1-p72). In einem zweiten Inkubationsschritt werden die gebundenen Antikörper klassenspezifisch durch sekundäre Meerrettich-Peroxidase (HRP)-konjugierte Antikörper nachgewiesen. Als Substrat wird TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) zugegeben, die Enzymreaktion mit Schwefelsäure gestoppt und die optische Dichte (OD) im Spektrophotometer bei 450nm gegen eine Referenzwellenlänge von 615-690nm gemessen. Zusätzlich wurden spezifische Antikörper mittels Immunfluoreszenz-Test (IFT) nachgewiesen. Dieser Test erlaubt die Bestimmung von Antikörpertitern (VCA [virus capsid antigen]-IgM, VCA-IgG, EA-IgG, EBNA).

Zum Nachweis von EBNA-spezifischen Antikörpern werden EBV-positive Zellen (Raji) auf Objektträger aufgebracht und fixiert. Das Patientenserum wird verdünnt und mit humanen Komplementproteinen versetzt. Es kommt zur Bildung von Antikörper-Komplement-Komplexen. Nach Aufbringen des Serums auf die Zellen binden die Komplexe an die EBNA-Proteine in den Zellen. Die Detektion erfolgt mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten anti-Komplement-Antikörpern. Um eine unspezifische Bindung der Komplementproteine an zelluläre Proteine zu erkennen, werden EBV-negative Zellen (BJAB) als Kontrolle eingesetzt.

Die Detektion aller anderen viralen Antigene erfolgt durch einen sogenannten "Sandwich-Test". EBV-positive Zellen (Raji bzw. P3-HR₁K) werden auf Objektträger aufgebracht und fixiert. Für die Detektion von IgM-Antikörpern werden zunächst mittels Protein A (aus *Staphylococcus aureus*) die IgG-Antikörper aus dem Patientenserum entfernt. Dann werden serielle Verdünnungen des Serums auf die Objektträger aufgebracht. Die spezifischen Antikörper binden an virale Antigene in den fixierten Zellen. Diese werden durch sekundäre, fluoreszenzmarkierte Antikörper nachgewiesen. Die Auswertung erfolgt für alle Antigene im Fluoreszenzmikroskop.

2.4 Quantitative PCR

Isolierung von peripheren Blutlymphozyten (PBL)

Die Gewinnung von peripheren Blutlymphozyten aus heparinisiertem oder mit EDTA behandeltem Vollblut erfolgte mittels Dichtegradientenzentrifugation. Das Blut wurde mit PBS verdünnt und über Ficoll (Dichte 1,077 g/ml, PAN Biotech, Aidenbach) geschichtet. Nach einer Zentrifugation bei 1000×g für 30 min bildeten sich Schichten aus Erythrozyten, Ficoll, Lymphozyten und Plasma. Die Lymphozyten wurden entnommen und zweimal mit PBS gewaschen.

Präparation von DNA und DNA-freier RNA

Zur Isolierung von DNA aus Zellen, Serum oder Zellkultur-Überstand wurden 2×10^5 Zellen bzw. 200 µl Serum oder Zellkultur-Überstand eingesetzt. Es wurde der *DNA Blood Mini Kit* der Firma QIAGEN (Hilden) verwendet. Die DNA wurde mit 100 µl RNase-freiem Wasser eluiert und bei -20°C gelagert. Für einige Anwendungen sollte eine größere Sensitivität erreicht werden. Es wurden deshalb 5×10^6 Zellen bzw. 1 ml Serum eingesetzt. Die DNA-Isolierung aus Serum erfolgte in diesem Fall mit dem *QiaAmp Ultrasens Virus Kit* (QIAGEN). Die DNA wurde zweimal mit je 50 µl RNase-freiem Wasser eluiert und bei -20°C gelagert.

RNA wurde aus 1×10^6 - 5×10^6 Zellen (PBL oder kultivierte Zelllinien) gemäß RNeasy-Protokoll (QIAGEN) isoliert. Die Homogenisierung des Zelllysats erfolgte mittels *QiaShredder*-Säulchen. Während der RNA-Isolierung wurde die an die Säule gebundene Nukleinsäure mit RNase-freier DNase behandelt, um DNA-Kontaminationen zu verringern (alle Protokolle von QIAGEN). Die RNA wurde zweimal mit je 30 µl RNase-freiem Wasser eluiert und bei -80°C gelagert.

Oligonukleotide

Als Sonden für die *real-time* PCR wurden 3'-FAM (6-Carboxyfluorescein) -, 5'-TAMRA (6-Carboxytetramethylrhodamin)-Fluoreszenz-markierte Oligonukleotide verwendet (Eurogentec, Seraing, Belgien). Unmarkierte Primer wurden von Metabion (Martinsried) bezogen. Alle Oligonukleotide wurden mit einer Endkonzentration von 100 µM in 10 mM Tris, pH 8,5 gelöst. Tabelle 3 zeigt die Sequenzen und den Verwendungszweck aller Primer und Sonden.

Name	Sequenz 3'-5'	Verwendungszweck
BZLF1-1	GCT TAA ACT TGG CCC GGC	Reverse Transkription, TaqMan-PCR
BZLF1-2	GGA GGA ATG CGA TTC TGA ACT AG	TaqMan-PCR
BZLF1*	TTT TCT GGA AGC CAC CCG ATT CTT GTA	TaqMan-PCR
Zm2/3 fw	GAG GCG CAG CCT GTC ATT T	PCR für Klonierung
Zm1/2 r	GGA CAA CAG CTA GCA GAC ATT GG	PCR für Klonierung
BALF5-1	AGG AGG GCT TCC CCA CG	Reverse Transkription, TaqMan-PCR
BALF5-2	TGT CGA CCA GAG GAC GCA G	TaqMan-PCR
BALF5*	CCA CCA ACG AGG CTG ACC TGA TCC T	TaqMan-PCR
BALF5-816 fw	CTG TGA GGT GGG CGA CCT C	PCR für Klonierung
BALF5-816 r	CCG ATG GGA ACT CGT AGA CC	PCR für Klonierung
BLLF1-1	GAA TTC TCA CAT CAA CGA GTC CC	Reverse Transkription, TaqMan-PCR
BLLF1-2	CAG ACG CAG GCT GTA TGC AT	TaqMan-PCR
BLLF1*	TGG CCA CCC CAA TAC CTG GTA CAG G	TaqMan-PCR
BLLF1-663 fw	TCT GCC CGG AGA CAA CAA AT	PCR für Klonierung
BLLF1-663 r	AAC ACA ATG TTG GAC TGA ATG CA	PCR für Klonierung
EBNA1-1	TGT GGG CCG GGT CCA	Reverse Transkription, TaqMan-PCR
EBNA1-2	CAC ATG TCG TCT TAC ACC ATT GA	TaqMan-PCR

EBNA1*	CGT CTC CCC TTT GGA ATG GCC C	TaqMan-PCR
EBNA1-237PCR fw	AGG CGA GGA ACT GCC CTT	PCR für Klonierung
EBNA1-237PCR r	ATA TAT GAG TTT GTA AAA AGA CC	Reverse Transkription für Klonierung, PCR für Klonierung
EBNA2-1	GGG ATG CCT GGA CAC AAG AG	PCR für Klonierung, Reverse Transkription, TaqMan-PCR
EBNA2-2	GTC CAT GCC CGA CGT CAT	TaqMan-PCR
EBNA2*	CAT CAC CTC TTG ATA GGG ATC CGA ACT AGG A	TaqMan-PCR
EBNA2-5PCR r	CTT GTG GCA AAA TAA GGC CC	Reverse Transkription für Klonierung, PCR für Klonierung
LMP1-1	GGC TAA GGG TCG GCG G	Reverse Transkription, TaqMan-PCR
LMP1-2	CGC CAC CTC ATT CTG RAA WTY	TaqMan-PCR
LMP1*	YCS CCG TCT GCT GCT TCG TCA	TaqMan-PCR
LMP1-5PCR fw	ATC CGC CAC CTC ATT CTG AA	PCR für Klonierung
LMP1-5PCR r	GCA GGC GGG AGG CTG T	Reverse Transkription für Klonierung, PCR für Klonierung
GAPDH-1 ¹	TTG ACG GTG CCA TGG AAT TT	Reverse Transkription, TaqMan-PCR
GAPDH-2 ¹	GCC ATC AAT GAC CCC TTC ATT	TaqMan-PCR
GAPDH* ¹	CCT CAA CTA CAT GGT TTA CAT GTT CCA ATA TGA TTC CAC	TaqMan-PCR
GAPDH-76	GTC GGA GTC AAC GGA TTT GG	Reverse Transkription für Klonierung
GAPDH-111 fw	GGT CAC CAG GGC TGC TTT TTA	PCR für Klonierung

GAPDH-111 r	TGG TGA TGG GAT TTC CAT TGA T	PCR für Klonierung
BamHI-W fw	GCC AGA CAG CAG CCA ATT GT	TaqMan-PCR
BamHI-W r	GAC TCC TGG CGC TCT GAT G	TaqMan-PCR
BamHI-W *	ACT GCC CCT GGT ATA AAG TGG TCC	TaqMan-PCR
BamHI-W-PCR fw	GGG AAA AGA GGA ATA AGC CCC	PCR für Klonierung
BamHI-W-PCR r	AAA GTT AGA AAC TGG GCC CGA	PCR für Klonierung
EBV-DNA fw	CCT CTT TTC CAA GTC AGA ATT TGA C	TaqMan-PCR
EBV-DNA r	TGA CCT CTT GCA TGG CCT CT	TaqMan-PCR
EBV-DNA *	CCA TCT ACC CAT CCT ACA CTG CGC TTT ACA	TaqMan-PCR

Tabelle 3: Sequenzen und Verwendungszweck der eingesetzten Oligonukleotide. TaqMan-Sonden (3'-FAM-, 5'-TAMRA-markiert) sind mit * gekennzeichnet.

¹ Primer- und Sondensequenzen für GAPDH wurden bereits beschrieben (Knerr et al., 2001).

Klonierung von DNA zur Herstellung von DNA- und RNA-Verdünnungsreihen

Zur Quantifizierung der viralen mRNAs wurden serielle Verdünnungen *in vitro* transkribierter RNA verwendet. Dazu wurden die entsprechenden Sequenzen aus revers transkribierter cDNA aus B95-8-Zellen (virale Transkripte) bzw. BJAB-Zellen (GAPDH) oder - für Transkripte ohne Intron - aus viraler DNA mittels herkömmlicher PCR amplifiziert (vgl. Primer in Tabelle 3). Die reverse Transkription erfolgte für 30 min bei 42°C in einem Reaktionsgemisch aus 5 mM MgCl₂, 1×PCR-Puffer (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8,3), je 4 mM dNTPs, 0,6 U/µl RNase Inhibitor, 1,6 U/µl Reverse Transkriptase und 265 nM spezifischem Primer. Anschließend folgte ein Hitzeschritt von 10 min bei 94°C. Die Reaktionsbedingungen für die herkömmliche PCR wurden in Vorversuchen

optimiert. Für alle Ansätze wurden 1×PCR-Puffer, 50×μM spezifische Primer, je 200 μM dNTPs und 25 U/ml AmpliTaq DNA-Polymerase (Perkin-Elmer-Applied Biosystems, Foster City, USA) verwendet. MgCl₂-Konzentrationen und *annealing*-Temperatur sind in Tabelle 4 angegeben. Nach einem Denaturierungsschritt von 5 min bei 95°C wurden 40 Zyklen mit jeweils 30 s bei 95°C, 30 s bei der angegebenen *annealing*-Temperatur und 30 s bei 72°C durchgeführt. Es folgte eine abschließende Inkubation von 10 min bei 72°C. Alle Inkubationen wurden in einem *Peltier Thermal Cycler* 200 (MJ Research, Waltham, USA) durchgeführt.

System	MgCl ₂	<i>annealing</i> -Temp	Amplikon
BZLF1	9 mM	56°C	237 bp
BALF5	7 mM	56°C	251 bp
BLLF1	7 mM	56°C	251 bp
EBNA1	5 mM	56°C	151 bp
EBNA2	7 mM	56°C	156 bp
LMP1	5 mM	56°C	154 bp
GAPDH	5 mM	60°C	171 bp
BamHI-W	4 mM	60°C	301 bp

Tabelle 4: Optimierte MgCl₂-Konzentrationen, *annealing*-Temperaturen und Länge der Amplikons für die herkömmliche PCR.

Die Amplifikate wurden auf einem präparativen 1%-Agarose-Gel aufgetrennt und gemäß dem *QIAquick gel-extraction* Protokoll (QIAGEN) aus der Gelmatrix aufgereinigt. Da die Amplifikation mit der verwendeten TaqPolymerase zu einem einzelnen Adenosin-Überhang am 3'-Ende der Amplifikate führt, konnten diese direkt mit dem pCRII-TOPO-Vektor (Invitrogen, Karlsruhe) ligiert werden, der über einen 5'-Thymidin-Überhang verfügt. Die Ligation und anschließende Transformation in chemisch kompetente *E. coli* (One Shot TOP10, Invitrogen) erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers. Die transformierten Bakterien wurden auf mit 1,6 mg X-Gal behandelten LB_{Amp}-Platten ausgebracht und über Nacht bei 37°C inkubiert. Es wurden dabei mittels der vom Vektor vermittelten Ampicillin-Resistenz und über die Blaufärbung von Kolonien, die den intakten Vektor ohne das gewünschte Insert enthalten, auf Kolonien selektioniert, die den

Vektor mit integriertem Insert aufgenommen hatten. Zunächst wurden mehrere 5 ml-Kulturen (LB_{Amp}) mit weißen Kolonien angeimpft und nach Inkubation über Nacht Plasmid-DNA isoliert (*Mini-Prep-Kit*, QIAGEN). Mittels PCR wurde die Vollständigkeit des Inserts überprüft und anschließend 200 ml LB_{Amp}-Kulturen angeimpft. Aus diesen Kulturen wurde wiederum Plasmid-DNA isoliert (*Maxi-Prep-Kit*, QIAGEN). Anhand der Absorption bei 260 nm wurde die Konzentration der DNA-Präparation mittels Photometer bestimmt. Um die Orientierung des Inserts im Vektor zu bestimmen, wurden das Insert sowie die angrenzenden Bereiche des Vektors sequenziert. Die Sequenzierung erfolgte durch die Firma GENEART, Regensburg.

Ca. 50 µg der DNA wurden mittels Restriktionsverdau innerhalb der Vektorsequenz hinter dem Insert linearisiert, auf einem Agarose-Gel aufgetrennt und aus der Gelmatrix aufgereinigt. Die *in vitro*-Transkription wurde mit dem *RiboMax large scale RNA production system* (Promega, Mannheim) gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Der verwendete Vektor enthält je einen Promotor für die Sp6- und die T7-RNA-Polymerase. Es kann deshalb je nach Orientierung des Inserts mit dem einen oder dem anderen Enzym RNA transkribiert werden. Bevor die Konzentration der RNA photometrisch anhand der Absorption bei 260 nm bestimmt wurde, mußte die Vektor-DNA effizient entfernt werden. Dazu wurde die RNA-Präparation mit RNase-freier DNase I (Roche, Basel, Schweiz) behandelt (siehe unten), anschließend über RNeasy-Säulchen aufgereinigt und mittels TaqMan-PCR die Reinheit der RNA überprüft. Bei Bedarf wurde die DNase-Behandlung nochmals wiederholt. Da die Länge der Transkripte bekannt ist (Insert + Vektoranteil), konnte aus der Konzentration auch die Anzahl der Transkripte berechnet werden. Dabei wurden die Formeln (1) und (3) verwendet.

$$(1) \quad pmol \text{ of } ssRNA = \mu g \text{ (of } ssRNA) \times \frac{10^6 pg}{1 \mu g} \times \frac{1 pmol}{340 pg} \times \frac{1}{N_b} = \frac{\mu g \text{ (of } ssRNA) \times 2941}{N_b}$$

$$(2) \quad pmol \text{ of } dsDNA = \mu g \text{ (of } dsDNA) \times \frac{10^6 pg}{1 \mu g} \times \frac{1 pmol}{660 pg} \times \frac{1}{N_b} = \frac{\mu g \text{ (of } dsDNA) \times 1515}{N_b}$$

$$(3) \quad mol / ml \times N_A = Kopien / ml \quad N_A = 6,022 \times 10^{23} \text{ Kopien / mol}$$

Formeln zur Berechnung von Kopienzahlen in RNA- bzw. DNA-Präparationen.
ssRNA=einzelsträngige RNA, dsDNA=doppelsträngige DNA, N_A =Avogadro-Zahl

Die Transkripte wurden in RNase-freiem Wasser mit 10 µg/ml tRNA seriell verdünnt (10^7 - 10^1 Transkripte / 1,5µl). In Tabelle 5 sind die Konzentrationen der Plasmid-Präparationen und der Transkripte, sowie die verwendeten Restriktionsenzyme (Roche) und RNA-Polymerasen angegeben.

Transkript	DNA-Konz. µg/ml	RNA-Konz µg/ml	Länge der Transkripte	RNA-Konz. n/µl	Restriktions- enzym	RNA- Polymerase
BZLF1	768	355	339 bp	$1,85 \times 10^{12}$	BamHI	T7
BALF5	140	287	367 bp	$1,38 \times 10^{12}$	BamHI	T7
BLLF1	360	264	365 bp	$1,28 \times 10^{12}$	XbaI	Sp6
EBNA1	72	73	270 bp	$4,77 \times 10^{11}$	BamHI	T7
EBNA2	615	311	270 bp	$2,04 \times 10^{12}$	XbaI	Sp6
LMP1	46	16	268 bp	$1,03 \times 10^{11}$	EcoRV	Sp6
GAPDH	182	337	305 bp	$1,96 \times 10^{12}$	XbaI	Sp6

Tabelle 5: Konzentrationen der Plasmid-Präparationen und der Transkripte, verwendete Restriktionsenzyme (Roche) und RNA-Polymerasen der einzelnen Systeme bei der *in vitro*-Transkription

Zur Bestimmung der Nachweisgrenzen der TaqMan-Systeme wurden außerdem DNA-Verdünnungsreihen hergestellt. Dazu wurden die Kopienzahlen der Plasmid-Präparationen mit Hilfe der Formeln (2) und (3) bestimmt, und die DNA ebenfalls seriell verdünnt (10^7 - 10^0 / 5µl). Genauso wurde für die DNA-Eichkurve für das System BamHI-W vorgegangen. Die Ausgangskonzentration war dabei 72 µg/ml, was $1,54 \times 10^{10}$ Kopien/µl entspricht. Auch für diese Eichkurve wurden serielle Verdünnungen (10^7 - 10^0 / 5µl) hergestellt.

Real-time PCR

Quantifizierung von mRNA

Da die DNase-Behandlung während der RNA-Isolierung kontaminierende DNA nicht vollständig entfernt, wurde unmittelbar vor der reversen Transkription ein zweiter DNase-Verdau, wie bereits in der Literatur beschrieben, durchgeführt (Dilworth & McCarrey, 1992). Dieser erfolgte im gleichen Reaktionsansatz wie die reverse Transkription. Isolierte RNA wurde mit dem Reaktionsmix für die reverse Transkription (siehe oben), jedoch ohne Reverse Transkriptase gemischt, 0,3 U/µl RNase-freie DNase (Roche) zugegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert. Um die DNase-Aktivität zu eliminieren folgte eine Hitzedenaturation bei 94°C für 5 min. Dieser Hitzeschritt wurde so optimiert, daß die RNA möglichst wenig geschädigt wird. Anschließend wurden 0,6 U/µl RNase-Inhibitor und 1,6 U/µl Reverse Transkriptase zugegeben. Die reverse Transkription wurde wie oben beschrieben durchgeführt. cDNA wurde sofort in die *real-time* PCR eingesetzt, da sich die Qualität der cDNA bei Lagerung verschlechtert (Daten nicht gezeigt). Bei der *real-time* PCR mit dem *TaqMan Sequence Detection System 7000* (Perkin-Elmer-Applied Biosystems), wird der Effekt des *fluorogenic resonance energy transfer* (FRET) zur Quantifizierung der amplifizierten DNA nach jedem PCR-Zyklus genutzt. Neben den beiden spezifischen Primern wird ein drittes, ebenfalls sequenzspezifisches Oligonukleotid zugegeben, das mit den Fluoreszenzfarbstoffen FAM und TAMRA markiert ist. In räumlicher Nähe wirkt TAMRA dabei als Quencher für FAM, d.h. nach Anregung von FAM mit Licht der Wellenlänge 488 nm wird von FAM kein Licht emittiert, sondern die Energie stattdessen von TAMRA aufgenommen, das seinerseits dann Licht der Wellenlänge 582 nm emittiert. Bei der Amplifikation der DNA wird die Sonde verdrängt und von der Exonuklease-Aktivität der TaqPolymerase in einzelne Nukleotide gespalten. Dabei werden die beiden Farbstoffe räumlich getrennt, der

Energietransfer kann nicht mehr stattfinden. FAM emittiert ohne den Quenching-Effekt nach Anregung Licht der Wellenlänge 518 nm. Der Anstieg der Fluoreszenzintensität bei 518 nm ist also direkt proportional zur Menge der amplifizierten DNA und kann nach jedem PCR-Zyklus gemessen werden.

Die Konzentrationen für die Komponenten des PCR-Ansatzes wurden für jedes System optimiert und sind in Tabelle 6 dargestellt. Für alle Systeme wurde 1×TaqMan-Puffer und 25 U/ml AmpliTaq Gold (Perkin-Elmer-Applied Biosystems) verwendet. Nach einer initialen Denaturierung von 10 min bei 95°C folgten 45 Zyklen eines 2-Stufen-Temperaturprofils. Dabei wird bei 95°C für 5 s denaturiert, anschließend findet bei 60°C für 1 min sowohl das *annealing* als auch die Amplifikation der DNA statt.

Als Eichkurve zur Quantifizierung der RNA-Menge in unbekannten Proben dienten serielle Verdünnungen *in vitro* transkribierter RNA.

Neben den viralen Transkripten wurde in jeder Probe auch die mRNA des zellulären *house-keeping-Gens* GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) quantifiziert, um die Effizienz der RNA-Präparation zu überprüfen und Proben zu identifizieren, bei denen die PCR inhibiert ist.

System	MgCl ₂	Primer	Sonde
BZLF1	9 mM	300 nM	50 nM
BALF5	7 mM	300 nM	100 nM
BLLF1	7 mM	300 nM	200 nM
EBNA1	5 mM	600 nM	100 nM
EBNA2	7 mM	300 nM	100 nM
LMP1	5 mM	600 nM	100 nM
GAPDH	5 mM	600 nM	100nM
BamHI-W	5 mM	300 nM	150 nM
EBV-DNA	5 mM	900 bzw. 300 nM*	150 nM

Tabelle 6: Reaktionsmix für die *real-time* PCR.

* Beim System "EBV-DNA" wurden im Gegensatz zu allen anderen Systemen unterschiedliche Konzentrationen für 3'- bzw. 5'-Primer verwendet.

Quantifizierung von DNA

Die Quantifizierung viraler DNA erfolgte ebenfalls mittels *TaqMan*-PCR. DNA wurde aus 2×10^5 PBL bzw. 200 µl Serum isoliert. 5 µl DNA (entsprechend 1×10^4 PBL bzw. 10 µl Serum) wurden für die PCR eingesetzt und mit einem Mastermix aus 5 mM $MgCl_2$ je 4 mM dNTPs, 900 bzw. 300 nm Primer, 150 nM Sonde, 1×*TaqMan*-Puffer und 25 U/ml *AmpliTaq Gold* (beides Perkin-Elmer-Applied Biosystems) gemischt. Dieses System wurde als "EBV-DNA" bezeichnet. Die Nachweisgrenze dieses Systems liegt bei 100-1000 Kopien / 10^6 Zellen bzw. ml Serum oder Zellkultur-Überstand. Als Standard dienten serielle Verdünnungen von Plasmid-DNA. Wo nicht anders angegeben wurden die DNA-Quantifizierungen im Rahmen dieser Arbeit mit diesem System durchgeführt.

Im Rahmen dieser Arbeit ergaben sich einige Fragestellungen für die das System "EBV-DNA" nicht sensitiv genug war. Aus diesem Grund wurde ein weiteres, deutlich sensitiveres System zur Quantifizierung von EBV-DNA etabliert. Zur Verbesserung der Sensitivität wurde mehr Ausgangsmaterial zur DNA-Isolierung eingesetzt (vgl. oben) und eine effektivere Methode zur Isolierung aus Serum benutzt. Außerdem wurde für dieses als "BamHI-W" bezeichnete System eine repetitive Sequenz im EBV-Genom genutzt (im Bereich des BamHI-W-Fragments). Diese Region enthält 7-12 Wiederholungen der gleichen Sequenz. Wie für die anderen PCR-Systeme dienten serielle Verdünnungen einer Plasmid-Präparation als Eichkurve. Die Nachweisgrenze mit diesem System liegt bei 4-6 Kopien / 10^6 PBL bzw. 7-12 Kopien / ml Serum. Tabelle 6 zeigt die spezifischen Reaktionsbedingungen für diese beiden PCR-Systeme.

2.5 ELISPOT-Assay

CD8⁺ T-Lymphozyten sind in der Lage mit Fremdpeptiden beladene MHC-Klasse I-Moleküle auf Zielzellen spezifisch zu erkennen und durch Ausschüttung von Perforin und Granzymen die Zielzelle zu eliminieren. Neben diesem zytotoxischen Effekt reagieren die T-Lymphozyten auf Stimulation mit spezifischem Antigen mit der Sezernierung von Interferon- γ (IFN- γ). Mit dem *enzyme-linked-immunospot*-Assay (ELISPOT) können IFN- γ -sezernierende Zellen auf Einzelzellniveau detektiert werden (Abbildung 3).

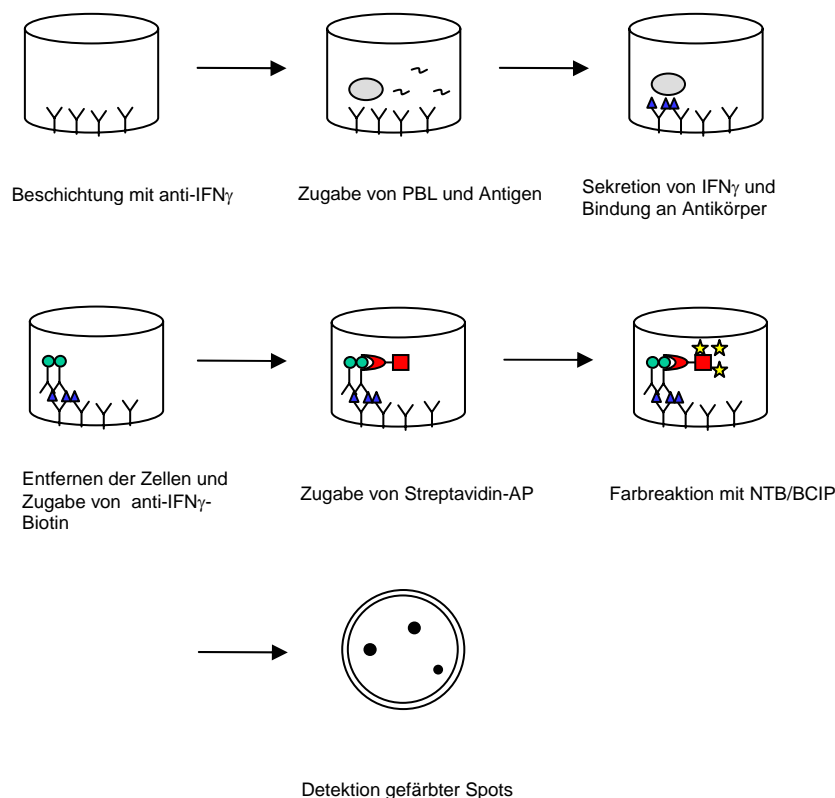


Abbildung. 3: Schematische Darstellung eines ELISPOT-Assays.

Die dafür benötigten peripheren Blutlymphozyten wurden wie bereits oben beschrieben isoliert. 96-well-Nitrozellulose-Platten (MAHA NS45, Millipore, Eschborn) wurden mit 5 μ g/ml des monoklonalen anti-IFN γ -Antikörpers 1-D1K (Mabtech, Stockholm, Schweden) beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Platten wurden dann für 2h bei Raumtemperatur mit RPMI 1640 + 10%

hitzeinaktiviertem FCS geblockt, um unspezifische Bindungen abzusättigen. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS wurden 2×10^5 PBL in 100 μ l T-Zell-Medium (RPMI 1640 mit 2 mM L-Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat, 100 U/l Penicillin, 100 μ g/ml Streptomycin und 10% hitzeinaktiviertem Humanserum Typ AB, PAN) pro well verteilt und 50 μ l der entsprechenden Peptide (30 μ g/ml in T-Zell-Medium) zugegeben (vgl. Tabelle 7). Während einer 24stündigen Inkubation bei 37°C, 5% CO₂ binden die Peptide an MHC-Klasse I-Moleküle, spezifische CD8⁺ T-Lymphozyten werden stimuliert und sezernieren IFN- γ . Nach dem Entfernen des Mediums wurden die Platten 10 min bei 4°C mit PBS + 0,1% Tween 20 (Sigma) inkubiert und anschließend mehrmals mit PBS gewaschen um die Zellen zu entfernen. Anschließend wurde der biotinylierte anti-IFN γ -Antikörper 7-B6-1-biotin (Mabtech) zugegeben (1 μ g/ml) und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS wurden die Platten 2h bei 37°C mit Streptavidin-Alkalische-Phosphatase-Konjugat (1 μ g/ml) inkubiert. Die Detektion der IFN- γ -Spots erfolgte durch Zugabe von NBT/BCIP-Lösung (Roche), 1:50 in Detektionspuffer (0,1 M Tris, 0,05 M MgCl₂, 0,1 M NaCl, pH 9,5) verdünnt. Nach einigen Minuten wurde die kolorimetrische Reaktion mit deionisiertem Wasser gestoppt und die Platten bei Raumtemperatur getrocknet. Die Auswertung erfolgte an einem BIOREADER 2000 (BioSys, Karben)

Sequenz	Protein	Virus	HLA-Restriktion
DTPLIPLTIF	EBNA1	EBV	A2; B51
FLRGRAYGL	EBNA3A	EBV	B8
RPPIFIRRL	EBNA3A	EBV	B7
YPLHEQHGM	EBNA3A	EBV	B35
SVRDLRLARL	EBNA3A	EBV	A2
TYSAGIVQI	EBNA3B	EBV	A24
VEITPYKPTW	EBNA3B	EBV	B44
EENLLDFVRF	EBNA3C	EBV	B44
RAKFKQLL	BZLF1	EBV	B8
GLCTLVAML	BMLF1	EBV	A2
RVRAYTYSK	BRLF1	EBV	A3
RGPGRAFVTI	gp160	HIV	A2

Tabelle 7: Aminosäuresequenzen der verwendeten Peptide (Affina Immuntechnik, Hamburg). Für die Analyse der zellulären Immunität nach Nierentransplantation wurden jeweils die Peptide, die der HLA-Konstellation des Patienten entsprechen eingesetzt. Die drei für HLA-B8-positive Patienten nach Stammzelltransplantation verwendeten Peptide sind grau hinterlegt.

2.6 Computerprogramme

Primer und Sonden für herkömmliche und *real-time* PCR wurden mit Hilfe der *Primer Express* Software, die vom Hersteller des *TaqMan Sequence Detection* Systems bereitgestellt wird, ausgewählt (Perkin-Elmer-Applied Biosystems). Für die TaqMan-PCR wurde auf vergleichbare Schmelzpunkte der Primer ($\Delta T_m(\text{max})=2^\circ\text{C}$), Kürze des Amplikons und geringen G-Gehalt der Sonde geachtet.

Der Text dieser Arbeit wurde mit dem Programm Microsoft Word 2000 erstellt. Außerdem kamen Microsoft Excel 2000, SigmaPlot 2001 und Reference Manager 9 zum Einsatz.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung von PCR-Systemen zum Nachweis viraler DNA und mRNA

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein hochsensitives PCR-System zum Nachweis EB-viraler DNA etabliert, so daß auch geringe Mengen viraler DNA in latent infizierten B-Zellen gesunder Virusträger detektiert werden können.

Als Hauptziel sollte die Expression verschiedener viraler Gene analysiert werden. Dazu wurden *real-time* RT-PCR-Systeme für drei latente und drei lytische virale Transkripte etabliert, die eine Quantifizierung von mRNA ermöglichen. Da nicht alle viralen Transkripte gespleißt sind, und deshalb RNA und DNA anhand der Sequenz nicht unterschieden werden können, mußte eine Methode entwickelt werden kontaminierende DNA zuverlässig zu entfernen ohne die RNA zu schädigen. Die Zuverlässigkeit, Reproduzierbarkeit und Empfindlichkeit dieser Systeme wurde eingehend getestet und die Methode soweit optimiert, daß ein Einsatz in der Routine-Diagnostik möglich ist.

3.1.1 Hochsensitive *real-time* PCR für virale DNA

Die Nachweisgrenze des als "EBV-DNA" bezeichneten Systems liegt bei 100-1000 Kopien / 10^6 PBL. Für einige Fragestellungen im Rahmen dieser Arbeit war jedoch eine höhere Sensitivität erforderlich. Es wurde deshalb mehr Material in die DNA-Isolierung eingesetzt und außerdem ein sensitiveres PCR-System entwickelt. Im Bereich des Fragments BamHI-W findet man im viralen Genom repetitive Elemente, bei denen eine Sequenzfolge 7-12mal wiederholt wird. Eine Quantifizierung dieses Bereichs erhöht die Sensitivität, weil ein Genomäquivalent die zu detektierende Sequenz mehrfach enthält. Analog zu den RT-PCR-Systemen wurden Primer- und SONDENSEQUENZEN ausgewählt und die Reaktionsbedingungen der PCR optimiert. Serielle Verdünnungen einer Plasmidpräparation dienten als Eichkurve.

Dabei wurden 10 Plasmidkopien als Genomäquivalent definiert. Die Angabe Kopien / well bezieht sich in diesem Zusammenhang immer auf Genomäquivalente. Wie in Abbildung 4 gezeigt konnte die Nachweisgrenze bei diesem System auf 1 Kopie / well gesteigert werden, was 4-6 Kopien / 10^6 Zellen bzw. 7-12 Kopien / ml Serum entspricht.

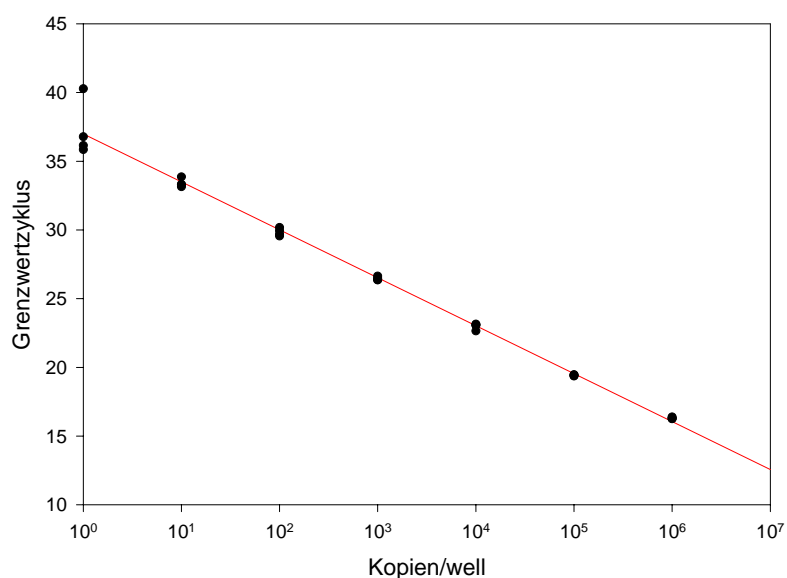


Abb. 4. Eichkurve des Systems BamHI-W aus seriellen Verdünnungen einer Plasmidpräparation. Für alle Verdünnungsstufen sind Vierfach-Werte gezeigt.

3.1.2 Quantitative RT-PCR zum Nachweis viraler Transkripte

Die Quantifizierung verschiedener viraler Transkripte der Latenz und des lytischen Zyklus ermöglicht den Nachweis und die Charakterisierung viraler Replikation und verschiedener Expressionsmuster während der Latenz.

Es wurden Transkripte aus den einzelnen Stadien der viralen Replikation ausgewählt, um den Verlauf des lytischen Zyklus zu charakterisieren. Der *immediate-early* Transaktivator BZLF1, wird - wie bereits oben beschrieben - als erstes Gen nach der Induktion des lytischen Zyklus exprimiert und steht am Anfang der folgenden Aktivierungskaskade. Als Vertreter der *early*-Gene wurde die virale DNA-Polymerase BALF5 ausgewählt. Diese Polymerase ist für die Replikation des viralen Genoms während des lytischen Zyklus verantwortlich und für die Vermehrung des Virus essentiell. Das virale Glykoprotein gp350/220 (BLLF1) findet man in großen Mengen auf der Virusmembran, sowie auch auf der Zytoplasmamembran infizierter Zellen. Wie alle Strukturproteine wird BLLF1 spät im Replikationszyklus exprimiert (*late* Gen). Wie bereits in Kapitel 1.2.3 dargestellt werden in der Literatur verschiedene Stufen der Latenz unterschieden, die durch unterschiedliche Expressionsmuster charakterisiert werden. Für diese Arbeit wurden die Transkripte EBNA1, EBNA2 und LMP1 für die Quantifizierung ausgewählt. Anhand dieser drei Transkripte können die drei Latenzformen, die nach Thorley-Lawson (Thorley-Lawson et al., 1996) bzw. Young (Young et al., 2000) als Latenz I, II und III bezeichnet werden, unterschieden werden. Um die Qualität der RNA-Präparationen überprüfen zu können wurde außerdem ein vergleichbares System für das zelluläre *house-keeping*-Gen GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) eingesetzt (Knerr et al., 2001). Für alle Systeme wurden mehrere Primer- und Sondensequenzen getestet und die Reaktionsbedingungen der *real-time* PCR optimiert.

Präparation DNA-freier RNA

Zur Quantifizierung von mRNA werden häufig Sonden verwendet, die sich über Intron-Exon-Grenzen erstrecken, um auf diese Weise zwischen DNA- und RNA-Sequenzen zu unterscheiden. Dies ist jedoch für BALF5 nicht möglich, da dieses Gen nicht gespleißt wird. Das Gen BLLF1 wird in zwei Spleißvarianten exprimiert, was zu den beiden Proteinformen gp350 und gp220 führt (Beisel et al., 1985). Die Mengenverhältnisse der beiden Transkripte sind in verschiedenen Zelllinien sehr unterschiedlich und verändern sich nach Induktion des lytischen Zyklus (Beisel et al., 1985; Biggin et al., 1984; Hummel et al., 1984). Es wurde in dieser Arbeit deshalb ein Bereich innerhalb des beiden Transkripten gemeinsamen Exons, also die Gesamtmenge an BLLF1-Transkripten quantifiziert. Um die Vorgehensweise zu vereinheitlichen wurden für alle Transkripte Systeme innerhalb eines Exons entwickelt, so daß keine Unterscheidung von gespleißten und ungespleißten Transkripten erforderlich ist. Dies ermöglicht es auch mit der gleichen Vorgehensweise unabhängig von Spleißvorgängen weitere PCR-Systeme für virale Transkripte zu etablieren. Allerdings kann dann nicht anhand der Sequenz zwischen DNA und RNA unterschieden werden, was die Präparation DNA-freier RNA erforderlich macht. Dabei ist besonders zu beachten, daß im Zuge der DNase-Behandlung in der Regel auch RNA degradiert wird. Deshalb war es notwendig die Methode der RNA-Isolierung sowie die folgenden Schritte der DNase-Behandlung aufeinander abzustimmen und so zu optimieren, daß zunächst möglichst effizient RNA isoliert und dann schonend die DNA entfernt wird. Zur Etablierung dieser Methode wurde mit Phorbolester und Buttersäure der lytische Zyklus in Raji-Zellen induziert und RNA aus diesen Zellen isoliert. Die RNA-Isolierung mit dem RNeasy Mini Kit (QIAGEN) ist schnell und auch für größere Probenmengen einfach durchzuführen. Allerdings sind dabei auch große Mengen DNA in der Präparation enthalten. Es wurden deshalb verschiedene Methoden zur Entfernung der DNA getestet (Abbildung 5). Die Behandlung mit DNase während der RNA-Isolierung reduziert die DNA-Kontaminationen um den Faktor 100, reicht jedoch nicht aus um die DNA vollständig zu entfernen. Auch ein DNase-Verdau unmittelbar vor der reversen Transkription eliminiert die DNA nicht vollständig. Bei dieser Methode wird die DNase direkt zum Reaktionsansatz für die reverse Transkription gegeben und das Enzym im Anschluß durch einen Hitzeschritt deaktiviert, bevor Reverse Transkriptase zugegeben wird (Dilworth &

McCarrey, 1992). Dadurch ist eine erneute aufwendige Reinigung der RNA nicht notwendig. Die Kombination beider Methoden reduziert die kontaminierende DNA auf eine Kopie in 10^5 Kopien RNA. Das Temperaturprofil wurde so angepaßt, daß ein geringstmöglicher Verlust an RNA erreicht wird. Das führte jedoch dazu, daß nach der reversen Transkription eine geringe Restaktivität der DNase zu beobachten war. Die Detektion der cDNA mittels *real-time* PCR erfolgte deshalb unmittelbar nach der reversen Transkription. Eine Lagerung der cDNA war mit dieser Methode nicht möglich. Die Zuverlässigkeit des DNase-Verdaus wurde mehrfach getestet, so daß eine Überprüfung der RNA-Reinheit in den einzelnen Patientenproben nicht erforderlich war.

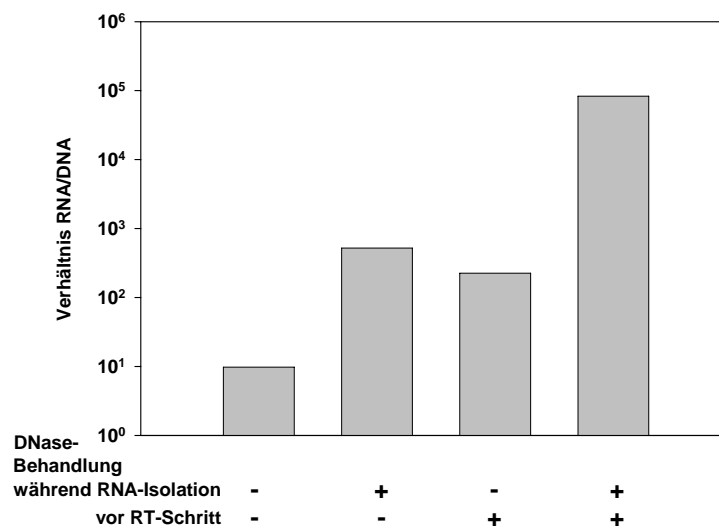
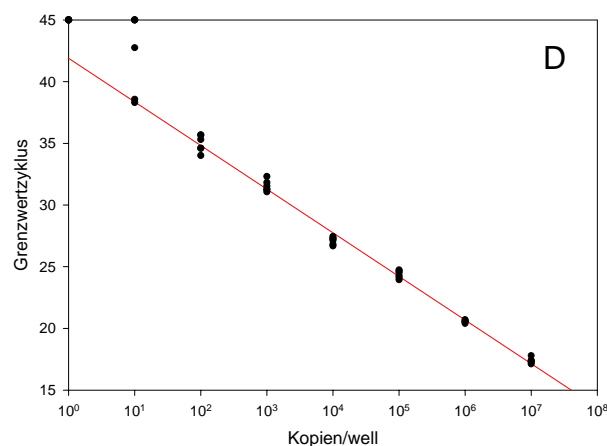
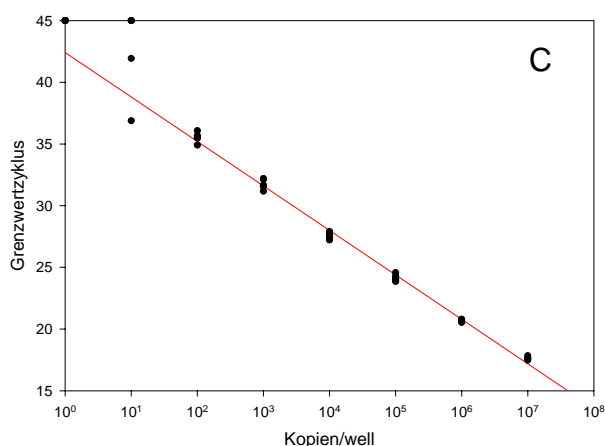
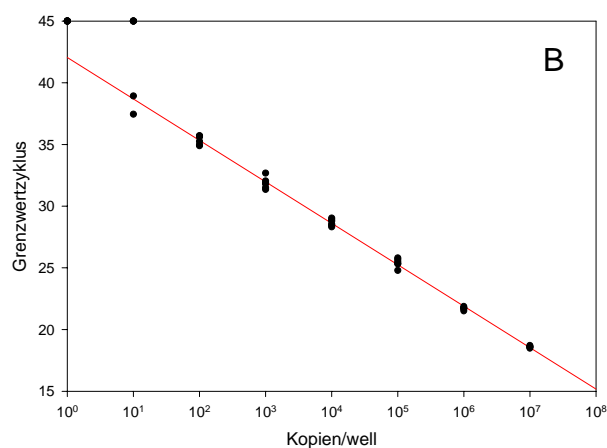
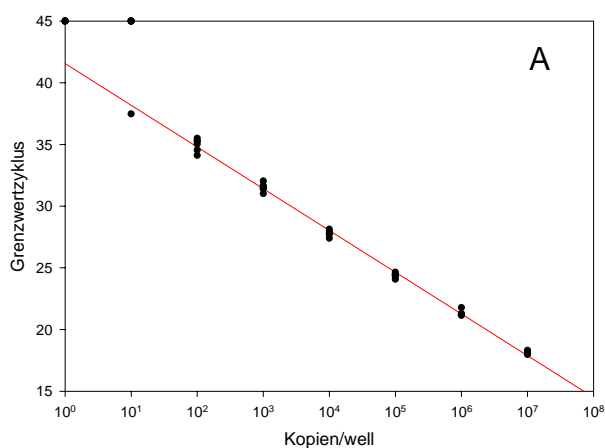


Abbildung 5: RNA wurde aus 5×10^6 mit Phorbol ester und Buttersäure induzierten Raji-Zellen isoliert und wie dargestellt mit DNase behandelt. Quantifiziert wurden Transkripte bzw. DNA des Gens BZLF1. In der Abbildung ist das Verhältnis RNA/DNA dargestellt.

Sensitivität der PCR-Systeme

Die Nachweisgrenze der PCR-Systeme wurde mit seriellen Verdünnungen *in vitro* transkribierter RNA getestet, die im Folgenden auch als Eichkurven dienten. Die Nachweisgrenze liegt bei 10-100 Kopien / well, was bei 5×10^6 eingesetzten PBL 80-800 Kopien / 10^6 PBL entspricht. Die Abbildungen 6A-G zeigen RNA-Eichkurven für alle etablierten RT-PCR-Systeme.

Die Sensitivität der Primer und Sonden wurde mit seriellen Verdünnungen von Plasmid-DNA ermittelt und liegt bei 1-10 Kopien / well. In Abb. 6H ist exemplarisch eine DNA-Eichkurve für BZLF1 gezeigt. Die Sensitivität der anderen Systeme war vergleichbar.



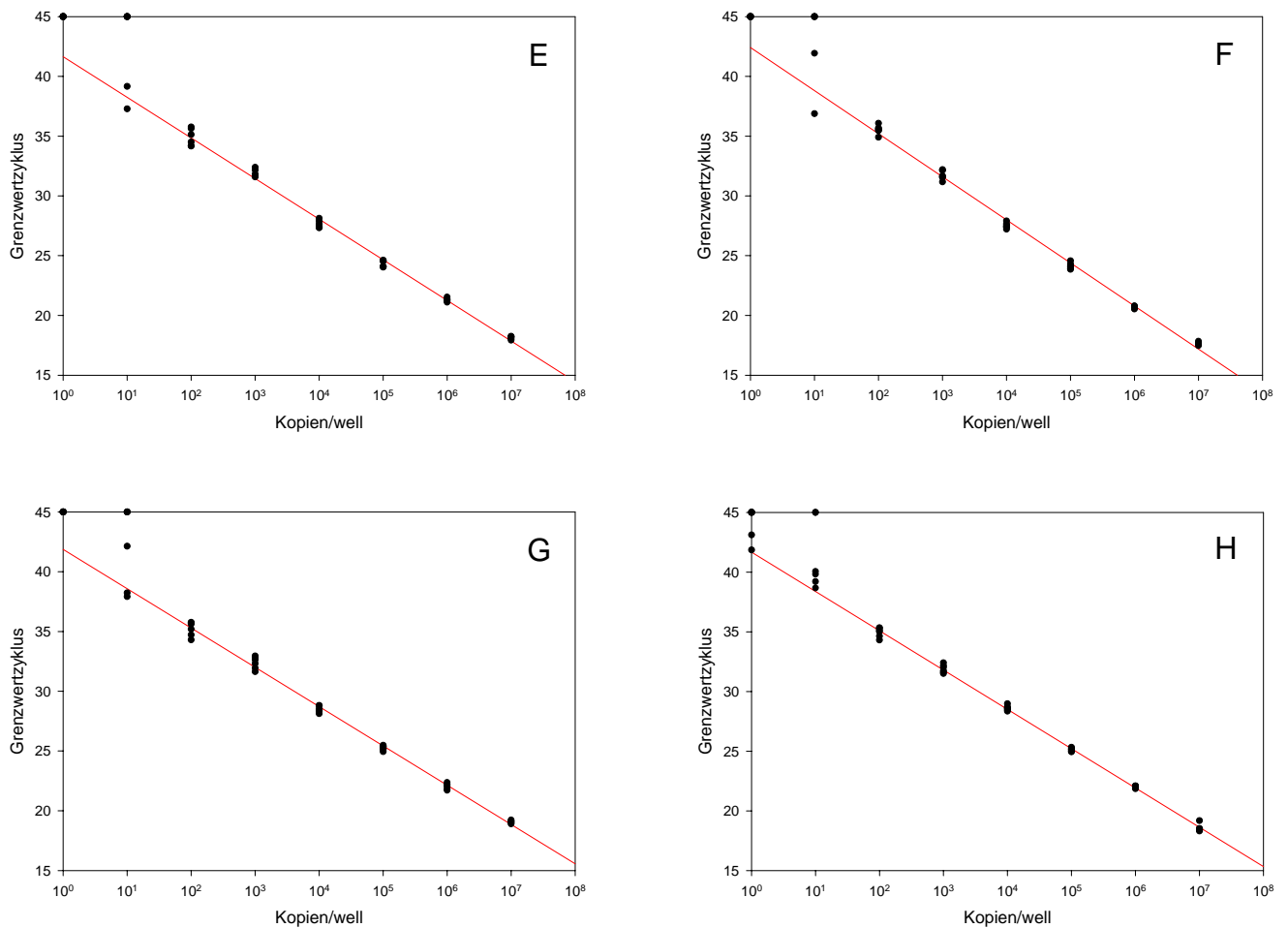


Abb. 6: (A) RNA-Eichkurve für das System BZLF1.
 (B) RNA-Eichkurve für das System BALF5
 (C) RNA-Eichkurve für das System BLLF1.
 (D) RNA-Eichkurve für das System EBNA1.
 (E) RNA-Eichkurve für das System EBNA2.
 (F) RNA-Eichkurve für das System LMP1
 (G) RNA-Eichkurve für das System GAPDH.
 (H) DNA-Eichkurve für das System BZLF1.

Dargestellt sind in allen Fällen Sechsfachwerte der einzelnen Verdünnungsstufen.

Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit

Für jeden einzelnen Schritt der RT-PCR wurde die Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit getestet.

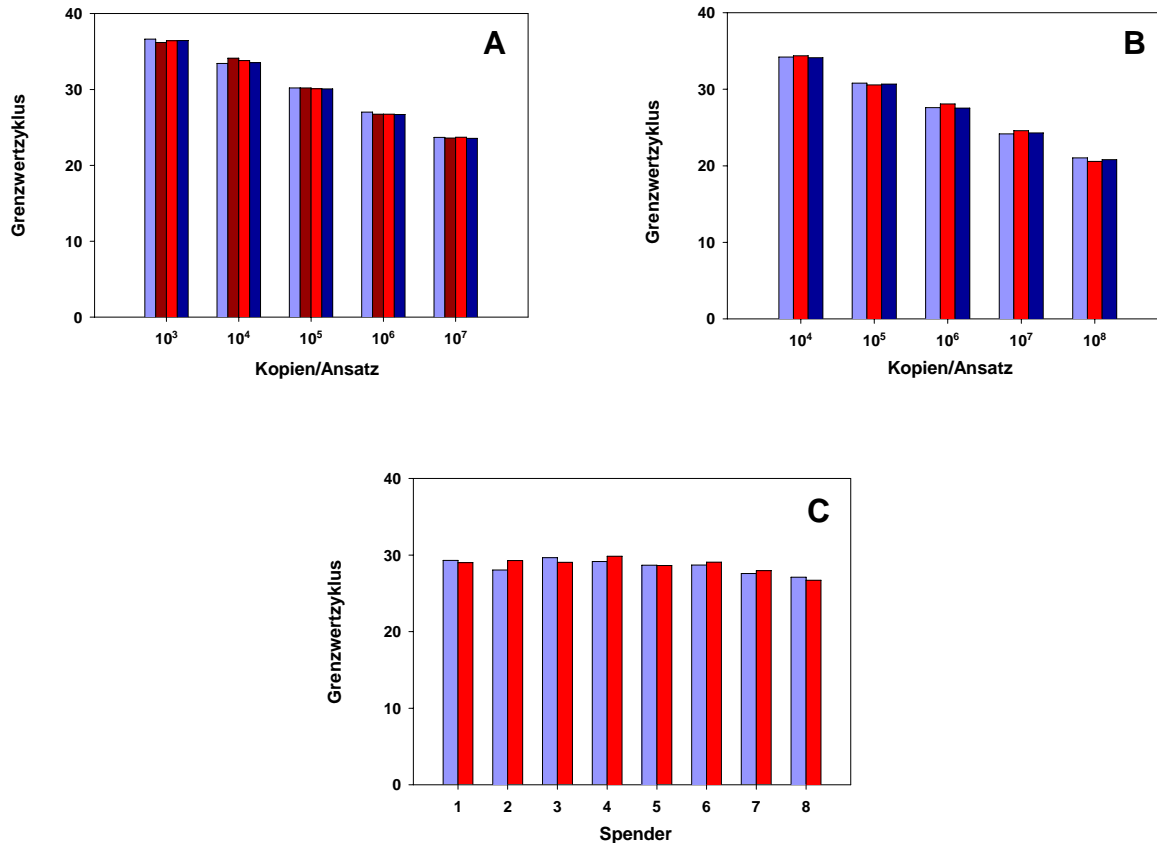


Abb. 7: (A) Gezeigt sind vier TaqMan-Replikate aus einer seriellen Verdünnung *in vitro* transkribierter RNA (BZLF1).

(B) Drei unabhängige cDNA-Präparationen aus einer seriellen Verdünnung *in vitro* transkribierter RNA (BZLF1). Dargestellt sind Mittelwerte aus vier PCR-Replikaten.

(C) Je zwei RNA-Isolierungen aus PBL von 8 gesunden Spendern. Quantifiziert wurden GAPDH-Transkripte in vier PCR-Replikaten.

Serielle Verdünnungen *in vitro* transkribierter RNA wurden revers transkribiert und die cDNA in Vierfachansätzen mittels TaqMan-PCR amplifiziert. Die Varianz zwischen den Replikaten lag bei unter 0,7 Grenzwertzyklen, was einem Faktor von unter 1,6 im Ausgangsmaterial entspricht (Abbildung 7A).

Außerdem wurden drei unabhängige cDNA-Präparationen für jede Verdünnungsstufe hergestellt und ebenfalls mittels TaqMan-PCR amplifiziert. In

Abbildung 7B sind die Mittelwerte aus vier PCR-Replikaten gezeigt. Im Vergleich zu Abbildung 7A vergrößert sich die Varianz nicht.

Diese beiden Versuche wurden mit dem System BZLF1 durchgeführt.

Um die Zuverlässigkeit der RNA-Isolierung zu testen wurden periphere Blutlymphozyten von 8 gesunden Spendern isoliert und aus je 5×10^6 PBL zwei unabhängige RNA-Isolierungen durchgeführt. Es wurde dann die Expression des zellulären *house-keeping*-Gens GAPDH mittels RT-PCR quantifiziert (Vierfachwerte). Die Varianz zwischen den beiden RNA-Präparationen ist bei allen Spendern unter 2 Grenzwertzyklen. Außerdem konnte gezeigt werden, daß bei allen Spendern vergleichbare Mengen GAPDH-mRNA detektiert werden können (Abbildung 7C).

3.1.3 Expression viraler Gene in EBV-positiven Zelllinien

Zur Validierung der PCR-Systeme wurde die Expression viraler Gene in verschiedenen EBV-positiven Zelllinien untersucht. In der EBV-negativen B-Zelllinie BJAB wurde erwartungsgemäß keine virale mRNA detektiert. In den EBV-positiven Burkitt-Lymphom-Zelllinien Raji, Akata, P3-HR₁K und der lymphoiden Zelllinie B95-8 (aus Krallenaffen, mit humanem Epstein-Barr Virus infiziert) konnten latente und lytische virale Transkripte nachgewiesen werden. Dabei waren in der Regel latente Gene stärker exprimiert als Gene des lytischen Zyklus, da nur in einem kleinen Teil der Zellen spontan, also ohne chemische Induktion eine lytische Virusvermehrung stattfindet. In der Zelllinie P3-HR₁K ist keine EBNA2-mRNA detektierbar, da der Leserahmen für dieses Gen deletiert ist. Von den lytischen Genen zeigt in den meisten Zelllinien BLLF1 die stärkste Expression, was wahrscheinlich darauf zurückzuführen ist, daß dieses Gen für ein Strukturprotein codiert und deshalb eventuell stärker exprimiert wird als die Gene BZLF1 bzw. BALF5, die für einen Transkriptionsfaktor bzw. die DNA-Polymerase codieren (Abbildung 8).

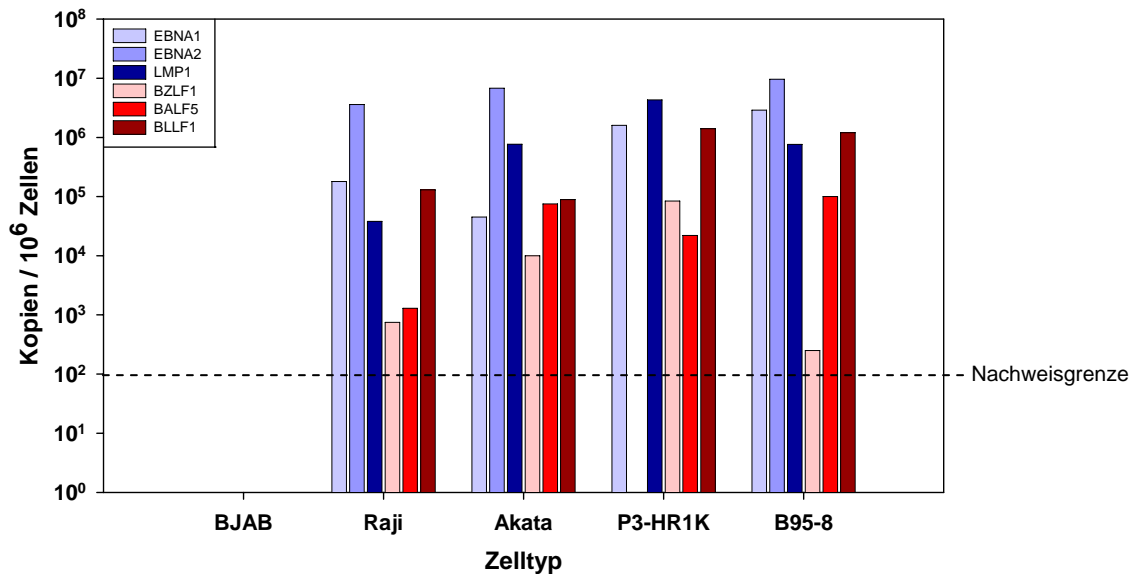


Abbildung 8: Quantifizierung viraler mRNA (EBNA1, EBNA2, LMP1, BZLF1, BALF5, BLLF1) in EBV-positiven Zelllinien ohne chemische Induktion. Die EBV-negative Zelllinie BJAB diente als Negativkontrolle. Dargestellt sind Kopien RNA / 10⁶ Zellen.

Die lytische Vermehrung kann in latent infizierten B-Zelllinien durch chemische Induktion mit Phorbol ester und Buttersäure verstärkt werden. Da jedoch einige Prozent der Zellen bereits spontan in den lytischen Zyklus eintreten und auch mit der Induktion nur maximal 50% der Zellen erreicht werden, ist die Veränderung der Expressionsmuster nach Induktion nicht sehr ausgeprägt. In der Regel findet man einen leichten Anstieg der mRNA-Menge lytischer Transkripte, während die Expression der latenten Gene leicht zurückgeht (Daten nicht gezeigt).

In gesunden Virusträgern ist nur 1 in 10⁵ bis 10⁶ B-Zellen mit EBV infiziert. Um diese Situation *in vitro* zu simulieren und die Effizienz des mRNA-Nachweises zu untersuchen wurden EBV-positive Raji-Zellen in unterschiedlicher Menge in EBV-negativen BJAB-Zellen verdünnt. In den Ansätzen waren 5×10⁶-5×10¹-Raji-Zellen und so viele BJAB-Zellen enthalten, daß insgesamt aus je 5×10⁶ Zellen RNA isoliert wurde. Latente Transkripte konnten bis zu einer Verdünnung von 50 Raji-Zellen pro Ansatz nachgewiesen werden. Da die lytischen Transkripte in geringerer Menge exprimiert werden, wurden für die Detektion dieser mRNAs entsprechend größere Mengen Raji-Zellen benötigt (Abbildung 9).

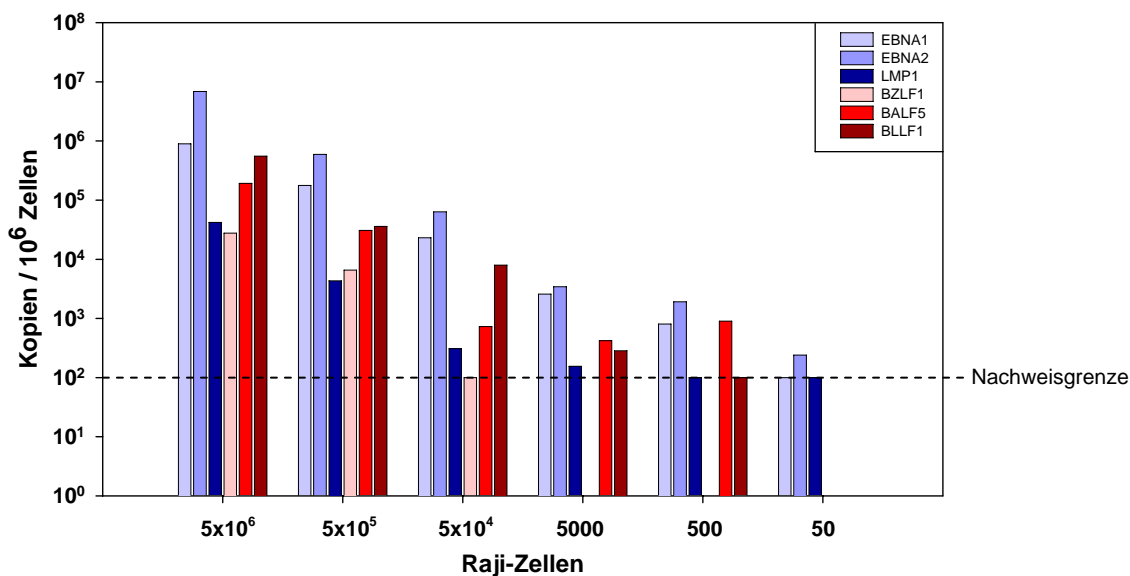


Abbildung 9: Quantifizierung viraler mRNA (EBNA1, EBNA2, LMP1, BZLF1, BALF5, BLLF1) in Raji-Zellen. EBV-positive Raji-Zellen wurden in EBV-negativen BJAB-Zellen verdünnt. Angegeben ist die Zahl der Raji-Zellen. Pro RNA-Isolierung wurden insgesamt 5×10^6 Zellen eingesetzt. Dargestellt sind Kopien RNA / 10^6 Zellen.

3.2 Analyse viraler Parameter bei gesunden Trägern

Gesunde Träger werden meist nur als Kontrollkollektiv bei Studien, die sich mit EBV-assoziierten Erkrankungen beschäftigen, untersucht. Dabei soll in der Regel der Unterschied zwischen gesunden und erkrankten Probanden herausgestellt werden. Dies führt dazu, daß z. B. bei der Bestimmung der Viruslast die Sensitivität des Nachweises häufig so gewählt wird, daß bei gesunden Trägern keine virale DNA nachgewiesen wird. Über die Expression viraler Gene gibt es weder bei gesunden Spendern, noch bei EBV-assoziierten Erkrankungen bisher umfassende Daten. Um die Analysen bei Patienten mit EBV-assoziierten Erkrankungen interpretieren zu können wurden deshalb zunächst umfassende Untersuchungen an gesunden Trägern durchgeführt.

An einem großen Kollektiv gesunder Träger wurden EBV-spezifische Antikörper und die Viruslast im Serum und in isolierten PBL untersucht.

Bei allen Probanden wurde eine latente Infektion mit EBV serologisch nachgewiesen (Durchseuchungstiter). Bei zwei Spendern ergaben sich serologische Hinweise auf eine Reaktivierung des Virus, d.h. EBV-spezifische

Antikörper der Klasse IgM konnten nachgewiesen werden. Allerdings korrelierte dieser Befund nicht mit der Viruslast, was dadurch zu erklären ist, daß die serologischen Marker erst nach der eigentlichen Reaktivierung, dann jedoch für einige Wochen, nachweisbar sind. Die serologischen Befunde, die für einen Durchseuchungstiter sprechen, können je nach Patient und eingesetztem Nachweisverfahren unterschiedlich sein. Entscheidend ist dabei der Nachweis von IgG-Antikörpern gegen EA (*early antigen*) und/oder VCA (*viral capsid antigen*) sowie Antikörpern gegen die latenten EBNA-Antigene. In Tabelle 8 sind die verschiedenen Konstellationen zusammengefasst.

ELISA			IFT				Zahl der Probanden
anti-EA-IgM	anti-EA-IgG	anti-EBNA1-IgG	anti-VCA-IgM	anti-VCA-IgG	anti-EA-IgG	anti-EBNA	
–	–	–	–	+	–	+	2
–	–	+	–	–	–	+	2
–	–	+	–	+	–	+	19
–	–	+	–	+	+	+	3
–	+	+	–	–	–	+	1
–	+	+	–	+	–	+	7
–	+	+	–	+	+	+	3

Tabelle 8: Serologische Konstellationen bei gesunden EBV-positiven Probanden, die als Durchseuchungstiter gewertet werden.

In gesunden Trägern sind nur wenige B-Zellen (1-50 in 10^6 B-Zellen) latent mit EBV infiziert. Mit dem normalerweise verwendeten PCR-System "EBV-DNA", dessen Nachweisgrenze bei 100-1000 Kopien / ml Serum bzw. 10^6 PBL liegt, ist deshalb in gesunden Spendern keine virale DNA nachweisbar.

Aus diesem Grund wurde das neu etablierte, hochsensitive PCR-System "BamHI" verwendet, das repetitive Sequenzen innerhalb des EBV-Genoms nutzt. Die Nachweisgrenze dieses Systems liegt bei 4-6 Kopien / 10^6 PBL bzw. 7-12

Kopien / ml Serum. Mit dieser Methode konnte bei 75% der Spender virale DNA in PBL nachgewiesen werden. Die Viruslast lag dabei in der Regel unter 25 Kopien / 10^6 PBL. Dies stimmt gut mit der Abschätzung überein, daß ungefähr eine Zelle in 2×10^5 bis 10^7 PBL infiziert ist. In zwei von 42 Spendern wurde eine Viruslast von ca. 80 bzw. 150 Kopien / 10^6 PBL detektiert. Diese Spender zeigten jedoch keine Auffälligkeiten in Bezug auf die Serologie oder die Viruslast im Serum. Im Serum konnte - auch mit der hochsensitiven Methode - deutlich seltener virale DNA nachgewiesen werden. Nur 10% der untersuchten Proben enthielten geringe Mengen EBV-DNA (unter 50 Kopien / ml Serum).

Bei 18 gesunden Trägern wurde außerdem die Expression viraler Transkripte untersucht. BZLF1- und BALF5-mRNA konnten bei diesen Probanden nicht nachgewiesen werden. Bei 2 Probanden (11,1%) konnten jedoch BLLF1-Transkripte detektiert werden. Die Expression von EBNA1 konnte bei 10 (55,6%), von EBNA2 bei 3 (16,7%) und von LMP1 bei einem Spender (5,6%) nachgewiesen werden (Tabelle 9)

	18 gesunde Träger
Proben (n)	18
BZLF1 (n _{pos.} [%])	0
BALF5 (n _{pos.} [%])	0
BLLF1 (n _{pos.} [%])	2 [11,1%]
EBNA1 (n _{pos.} [%])	10 [55,6%]
EBNA2 (n _{pos.} [%])	3 [16,7%]
LMP1 (n _{pos.} [%])	1 [5,6%]

Tabelle 9: Expression viraler Gene bei 18 gesunden Spendern. Die positiven Proben enthielten in der Regel 100-1000 Kopien / 10^6 PBL. In 3 der EBNA1-positiven Proben waren 10^3 - 10^4 Kopien / 10^6 PBL enthalten.

3.3 Analyse viraler Parameter bei einzelnen Patienten

Bei Patienten mit verschiedenen EBV-assoziierten Erkrankungen wurden Viruslast im Serum und in PBL quantifiziert und die Expression viraler Gene analysiert. Außerdem wurden die Patienten serologisch untersucht.

Dazu wurden bei den Patienten einige Milliliter Vollblut entnommen. Je nach Fragestellung erfolgte eine einmalige Blutentnahme bzw. mehrere Entnahmen in kurzen Abständen.

3.3.1 Patienten mit Infektiöser Mononukleose

Bei jungen Erwachsenen zeigen sich während der Primärinfektion mit EBV häufig Symptome der Infektiösen Mononukleose. Da die Symptome durch die Immunantwort und nicht durch die virale Replikation hervorgerufen werden, wird eine Infektiöse Mononukleose erst einige Tage nach der massiven Vermehrung des Virus diagnostiziert. Die Blutentnahme bei den folgenden Patienten erfolgte deshalb zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Primärinfektion. Dies erklärt die unterschiedlichen Expressionsmuster und DNA-Titer. Die Primärinfektion wurde bei allen Patienten serologisch bestätigt. Ausschlaggebend ist dabei die Anwesenheit von anti-EA- bzw. anti-VCA-IgM, ohne daß anti-EBNA-Antikörper nachweisbar sind.

Bei allen Patienten konnte virale DNA in Lymphozyten oder Serum, in den meisten Fällen in beiden Ausgangsmaterialien, nachgewiesen werden. Außerdem waren in allen Proben lytische Transkripte detektierbar. Die Expression latenter Transkripte war im Vergleich zu gesunden Spendern nur leicht erhöht (Abbildung 10).

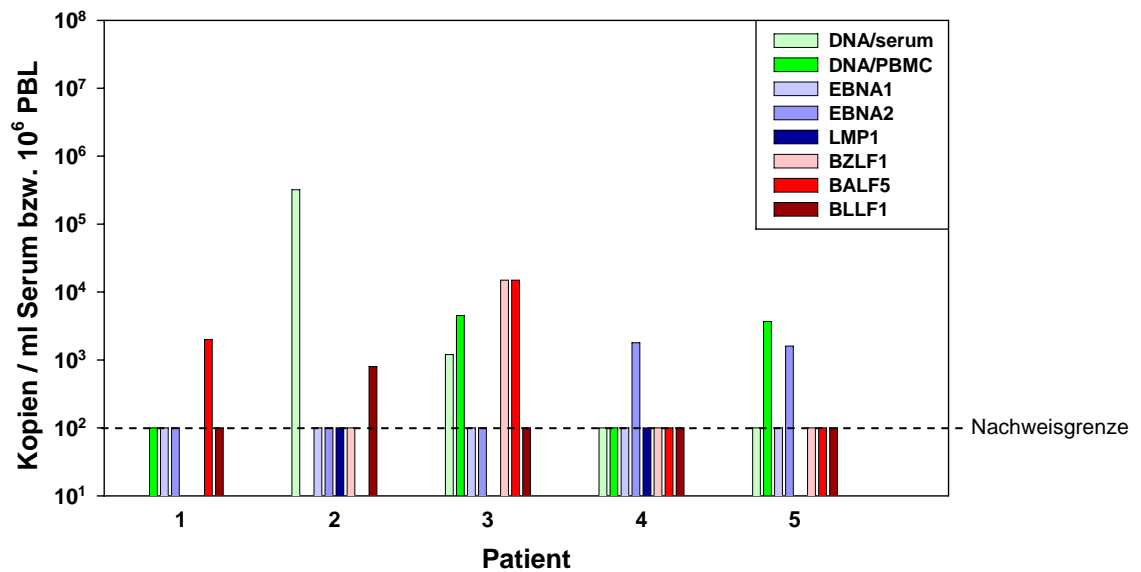


Abbildung 10: Viruslast im Serum (■), in PBL (■) und virale mRNA (■ EBNA1, ■ EBNA2, ■ LMP1, ■ BZLF1, ■ BALF5, ■ BLLF1) bei Patienten mit Infektiöser Mononukleose. Dargestellt sind Kopien DNA bzw. RNA / ml Serum oder 10⁶ PBL

3.3.2 Patientin mit fulminanter Primärinfektion

In seltenen Fällen kommt es bei primären EBV-Infektionen zu schweren Komplikationen. Bei einer 17jährigen Patientin wurde einige Wochen nach einer Infektiösen Mononukleose eine schwere Hepatitis diagnostiziert. Trotz intensivmedizinischer Versorgung verstarb die Patientin innerhalb von 48h aufgrund eines Leberversagens. Eine akute Infektion mit Hepatitisviren und anderen Herpesviren als EBV konnte ausgeschlossen werden. Postmortem wurden Blut- und Gewebeproben entnommen und EBV-DNA und -mRNA quantifiziert. Dabei wurde eine hohe Viruslast im Serum und in Lymphozyten, sowie in Biopsien von Lymphknoten, Milz und Leber nachgewiesen. Außerdem konnten aufgrund der Quantifizierung viraler mRNA sowohl latent infizierte B-Lymphozyten, als auch aktive lytische Vermehrung des Virus in den genannten Organen gezeigt werden (Tabelle 10).

	RNA						
	DNA	BZLF1	BALF5	BLLF1	EBNA1	EBNA2	LMP1
PBMC	$1,5 \times 10^5$	neg	$2,5 \times 10^7$	$1,0 \times 10^5$	$6,7 \times 10^4$	$<10^3$	$9,0 \times 10^4$
Milz	$3,0 \times 10^6$	neg	$1,0 \times 10^5$	$<10^3$	$<10^3$	neg	$<10^3$
Leber	$6,6 \times 10^5$	neg	$1,0 \times 10^5$	$<10^3$	$<10^3$	neg	$<10^3$
Lymphknoten (Trachea)	$5,6 \times 10^6$	$3,0 \times 10^3$	$2,1 \times 10^5$	$<10^3$	$<10^3$	$<10^3$	$<10^3$
Lymphknoten (Leber)	$4,5 \times 10^6$	$<10^3$	$3,8 \times 10^5$	$1,2 \times 10^3$	$<10^3$	neg	$<10^3$

Tabelle 10: Untersuchung verschiedener Gewebe einer an einer fulminanten EBV-Infektion verstorbenen Patientin. Angegeben sind DNA- und RNA-Mengen pro 10^6 Zellen. In Biopsien wurde die zelluläre DNA mit spezifischen Primern für die Pyruvat-Dehydrogenase (PDH) quantifiziert und so die Zellzahl in den Biopsien bestimmt.

3.3.3 Lymphoproliferatives Syndrom bei einem Patienten nach Stammzelltransplantation

Bei Patienten unter Immunsuppression z. B. nach Organtransplantationen erwartet man eine erhöhte EBV-Aktivität. Da die Funktion des Immunsystems eingeschränkt ist, sollte es vermehrt zur Expansion latent infizierter B-Zellen und/oder zur Reaktivierung des lytischen Zyklus kommen. Bei Patienten nach Stammzelltransplantation wird regelmäßig die Epstein-Barr Viruslast im Serum bestimmt. Bei einem 53jährigen Patienten nach allogener Stammzelltransplantation aufgrund eines Non-Hodgkin-T-Zell-Lymphoms wurde 24 Tage nach Transplantation erstmals virale DNA im Serum nachgewiesen. Dem Patienten waren periphere Stammzellen seiner HLA-identischen Schwester transplantiert worden. Um *Graft-versus-Host-Disease* zu verhindern, wurde vor der Transplantation eine Depletion der T-Zellen mittels anti-CD52-Antikörpern (Mabcampath®) durchgeführt. Nach der Transplantation erhielt der Patient Cyclosporin A zur Immunsuppression. Drei Tage nach dem positiven Virus-Nachweis traten Fieber, Lymphadenopathie und Splenomegalie auf. Außerdem stiegen die LDH-Werte (Laktatdehydrogenase, Marker für Leberschädigung) dramatisch an. Zunächst wurde ein Rezidiv der zugrunde liegenden Erkrankung vermutet, nach einer Knochenmarksbiopsie konnte jedoch ein lymphoproliferatives

Syndrom mit monoklonalen B-Zellen im peripheren Blut diagnostiziert werden. 31 Tage nach Transplantation wurde die Immunsuppression mit Cyclosporin A unterbrochen. An Tag 37 wurden Spenderlymphozyten transfundiert (5×10^6 CD3⁺ Zellen / kg) und eine antivirale Therapie zunächst mit Foscarnet, dann mit Aciclovir begonnen. Die Immunsuppression wurde für 30 Tage mit Kortison fortgeführt. An Tag 41 wurde erstmals Blut zur Analyse der viralen Transkription entnommen. In den PBL des Patienten konnten große Mengen viraler mRNA, sowohl latenter als auch lytischer Gene nachgewiesen werden. In den nächsten Tagen war ein weiterer Anstieg besonders der lytischen viralen Expression zu beobachten, bevor die mRNA-Menge abnahm und schließlich keine lytische virale RNA mehr nachweisbar war. Die Menge der latenten viralen Transkripte stabilisierte sich im Bereich der Nachweisgrenze. Auch die klinischen Symptome klangen ab, die LDH-Werte normalisierten sich. Während der Lymphoproliferation konnten auch große Mengen viraler DNA in Serum und PBL nachgewiesen werden (Abbildung 11).

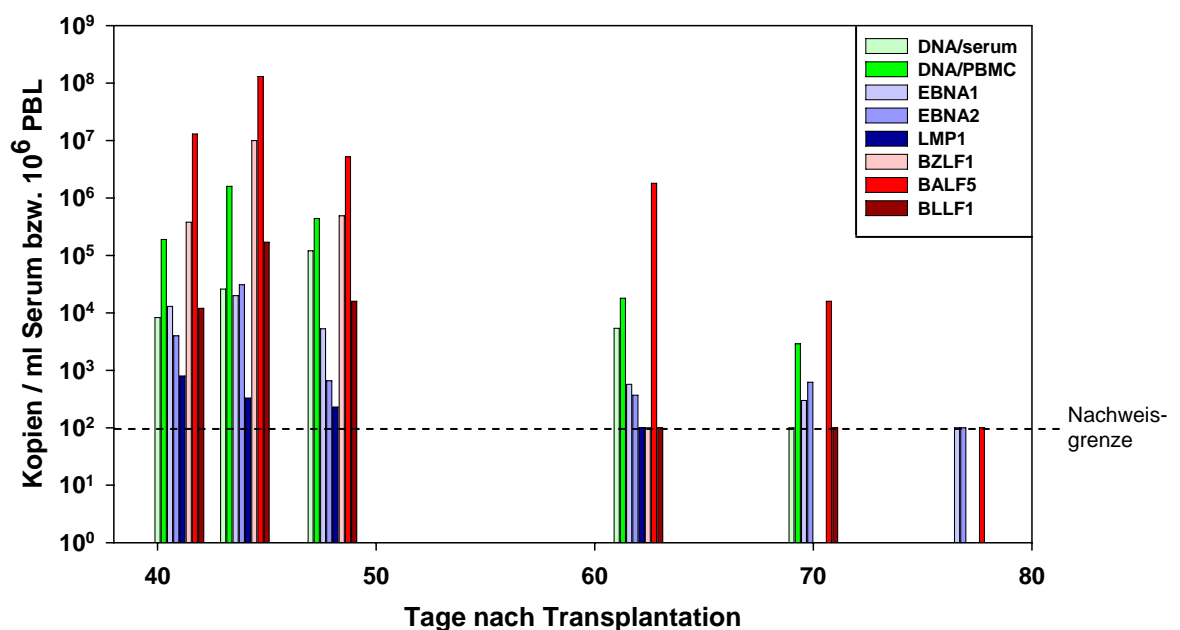


Abb.11: Viruslast im Serum (■), in PBL (■) und virale mRNA (■ EBNA1, ■ EBNA2, ■ LMP1, ■ BZLF1, ■ BALF5, ■ BLLF1) im zeitlichen Verlauf bei einem Patienten mit EBV-assoziiierter Lymphoproliferation nach allogener Stammzelltransplantation. Dargestellt sind Kopien DNA bzw. RNA / ml Serum oder 10^6 PBL. Auf der X-Achse sind Tage nach Transplantation dargestellt.

Bei diesem Patienten konnten während einer EBV-assoziierten Lymphoproliferation große Mengen virale mRNA nachgewiesen werden. Da mit der RNA-Analyse jedoch erst 15 Tage nach dem Beginn der Virämie begonnen wurde, läßt sich keine Aussage treffen, ob die beginnende Reaktivierung des Virus mit dieser Methode früher als durch den Nachweis von DNA im Serum hätte diagnostiziert werden können.

3.3.4 Nachweis von erhöhter viraler Aktivität bei einem Patienten nach Stammzelltransplantation

Dieser 62jährige Patient erhielt aufgrund eines multiplen Myeloms (Plasmozytom) Knochenmarkstammzellen eines nichtverwandten Spenders. Die T-Zellen des Transplantats wurden mit polyklonalen Kaninchenantikörpern (Thymoglobin) depletiert. Zur Immunsuppression nach Transplantation wurde Cyclosporin A und Mycophenolat-Mofetil eingesetzt. Im Rahmen der Routine-Diagnostik wurde 79 Tage nach Transplantation erstmals EBV-DNA im Serum nachgewiesen. Der Patient wurde ab diesem Zeitpunkt bis zu seinem Tod intensiv antiviral mit wechselnden Therapieschemata behandelt (Foscarnet, Aciclovir, Ganciclovir, Valganciclovir, z.T. in Kombination). Virale DNA war nur bis Tag 106 im Serum detektierbar, die DNA-Last in PBL sank, war jedoch 144 Tage nach Transplantation noch leicht erhöht. 99 Tage nach Transplantation wurde begonnen virale mRNA zu quantifizieren. Bis Tag 124 konnte die Expression lytischer Transkripte nachgewiesen werden (Abbildung 12). Über den gesamten Zeitraum der Analyse konnten geringe Mengen latenter viraler mRNA nachgewiesen werden.

Es gab klinisch keine Hinweise auf eine Lymphoproliferation oder ein Rezidiv des Plasmozytoms. Ungeklärt ist inwieweit die Reaktivierung von EBV für klinische Symptome und die folgenden Komplikationen verantwortlich war. Der Zustand des Patienten verschlechterte sich im folgenden Verlauf. Es trat eine Pneumonie und eine Katheter-Infektion auf. Außerdem kam es zu einem Anstieg der CMV-Last. Ähnlich wie für EBV ist unklar, inwieweit die Reaktivierung von CMV ursächlich zur Verschlechterung der Situation beitrug oder eine Folge des sehr kritischen Allgemeinzustands war. Der Patient verstarb 162 Tage nach Transplantation an Multiorganversagen.

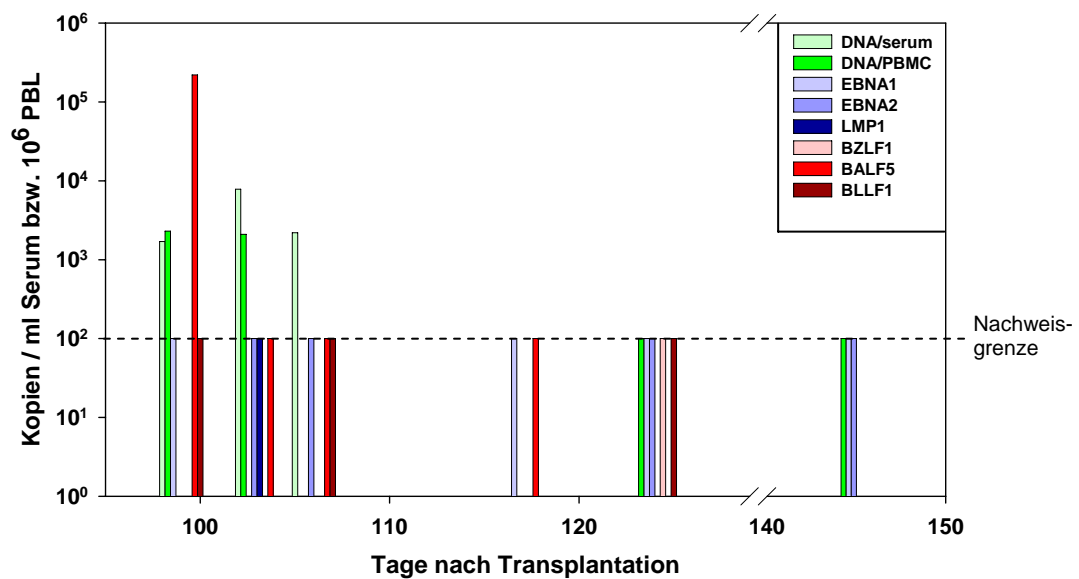


Abbildung 12: Viruslast im Serum (■), in PBL (■) und virale mRNA (■ EBNA1, ■ EBNA2, ■ LMP1, ■ BZLF1, ■ BALF5, ■ BLLF1) im zeitlichen Verlauf bei einem Patienten mit Plasmazytom-Rezidiv nach allogener Stammzelltransplantation. Dargestellt sind Kopien DNA bzw. RNA / ml Serum oder 10^6 PBL. Auf der X-Achse sind Tage nach Transplantation dargestellt.

3.4 Prospektive Studie bei Patienten nach Nieren- bzw. Stammzelltransplantation

Bei Patienten nach Nieren- bzw. Stammzelltransplantation wurden prospektiv EBV-spezifische Antikörper, Viruslast im Serum und in isolierten PBL, Expression viraler mRNA und - in ausgewählten Fällen - die EBV-spezifische zelluläre Immunantwort quantifiziert, um die virale Aktivität detailliert zu analysieren. Dazu wurde den Patienten in regelmäßigen Abständen im Rahmen der ambulanten Nachsorge Blut entnommen. Bei den Patienten nach Stammzelltransplantation erfolgte dies in Woche 2, 3 und 4 nach Transplantation und im Anschluß einmal monatlich. Bei den Nierentransplantierten wurden die Blutentnahmen in Woche 1, 2 und 4 bzw. Monat 2, 3, 6, 9 und 12 durchgeführt. Diese Termine ergaben sich durch die unterschiedlichen Untersuchungsintervalle in den Ambulanzen. Außerdem wurden 4 gesunde Virusträger als Kontrollkollektiv untersucht. Die Blutentnahmen bei diesen Probanden erfolgten nach dem Schema für Patienten nach Stammzelltransplantation.

3.4.1 Grunderkrankungen und Immunsuppression der Patienten

Die Immunsuppression nach Nierentransplantation erfolgte bei 14 Patienten mittels einer Kombination aus Tacrolimus, Mycophenolat-Mofetil und Prednisolon. 2 Patienten erhielten zusätzlich Cyclosporin A. Bei 4 Patienten wurde Tacrolimus durch Cyclosporin A ersetzt. Je ein Patient wurde mit Mycophenolat-Mofetil bzw. FTY720 in Kombination mit Prednisolon behandelt. Die Dosierung der einzelnen Substanzen wurde individuell auf den Patienten abgestimmt und im Verlauf der Therapie dem klinischen Verlauf immer wieder angepaßt. Die einzelnen Therapieschemata sind in Abschnitt 5.1, Tabelle 16 zusammengefaßt.

Die Transplantation von Stammzellen erfolgte bei allen Patienten aufgrund maligner Grunderkrankungen. Tabelle 11 faßt die Häufigkeit der verschiedenen Tumorarten bei den in dieser Studie eingeschlossenen Patienten zusammen.

Art des Tumors	Anzahl Patienten
Akute myeloische Leukämie (AML)	9
Non-Hodgkin-Lymphom (NHL)	4
Akute lymphatische Leukämie (ALL)	3
Osteomyelofibrose (OMF)	3
Multiples Myelom (MM)	2
Myelodysplastisches Syndrom (MDS)	2
Chronische myeloische Leukämie (CML)	1
Morbus Hodgkin (MH)	1

Tabelle 11: Indikationen für die Stammzelltransplantation bei den Patienten der hier dargestellten Studie.

Mit Ausnahme von 3 Patienten, die Knochenmarkszellen erhielten, wurden für die Transplantationen Stammzellen aus peripherem Blut gewonnen.

Die Patienten wurden vor der Transplantation zunächst konditioniert, d.h. das hämatopoetische System und damit auch die Tumorzellen durch Bestrahlung und/oder Chemotherapie zerstört. Die Konditionierung wurde individuell auf den Patienten abgestimmt. Nach der Transplantation erfolgte die Immunsuppression

zur GvH-Prophylaxe durch eine Kombination verschiedener Medikamente. Entsprechend dem klinischen Verlauf (Auftreten von GvHD, Infektionen) wurde die Immunsuppression individuell angepaßt. Die verschiedenen Therapiekombinationen sind im Abschnitt 5.1 (Tabellen 17 und 18) dargestellt. Die Konditionierung erfolgte bei 14 Patienten mit einer Kombination aus Bestrahlung (*total body irradiation*, TBI) und Chemotherapie mit verschiedenen Kombinationen aus alkylierenden Agentien, Topoisomerase-Hemmern und synthetischen Nukleotiden. 11 Patienten wurden nur medikamentös, d.h. ohne Bestrahlung, konditioniert. Bei diesen Patienten wurde ebenfalls Kombinationen der oben erwähnten Substanzklassen eingesetzt.

Zu Beginn der Immunsuppression erhielten alle Patienten Cyclosporin A, in der Regel in Kombination mit Prednisolon. Die Therapiekombinationen mit anderen Substanzen waren dabei von Patient zu Patient sehr unterschiedlich.

3.4.2 Analyse EBV-spezifischer Antikörper

Die Analyse EBV-spezifischer Antikörper zeigte nur geringe Unterschiede zwischen immunsupprimierten Patienten und dem Kontrollkollektiv gesunder Träger. Wie bereits in Abschnitt 3.2 gezeigt, kann das Antikörpermuster bei einer abgelaufenen EBV-Infektion variieren. Auch bei immunsupprimierten Patienten findet man in der Regel EBNA-spezifische Antikörper in Kombination mit EA- und/oder VCA-spezifischen IgG-Antikörpern. Die Antikörper-Titer für anti-EA- und anti-VCA-Antikörper wurden mittels Immunfluoreszenz-Test bestimmt. Titeranstiege der EBV-spezifischen Antikörper werden bei immunsupprimierten Patienten als Indikator für eine Reaktivierung des Virus angesehen. Die Analyse der Antikörpertiter bei 4 gesunden Spendern zeigte jedoch auch in immunkompetenten Probanden starke Schwankungen im zeitlichen Verlauf. Bei Patienten nach Transplantation fand man bis 12 Monate nach Transplantation Antikörpertiter, die mit denen in gesunden Trägern vergleichbar sind. Auch die Schwankungen im zeitlichen Verlauf waren in beiden Patientengruppen vergleichbar. Tabelle 19 in Abschnitt 5.2 zeigt die Ergebnisse der qualitativen ELISA-Tests (anti-EA-IgM, anti-EA-IgG, anti-EBNA-IgG) und der Immunfluoreszenz-Tests (anti-VCA-IgM, anti-VCA-IgG, anti-EA-IgG, anti-EBNA) für alle Probanden. In einigen Patienten unter Immunsuppression kann man vereinzelt IgM-Antikörper nachweisen, was für eine Reaktivierung des Epstein-Barr Virus spricht. Die Detektion dieser Antikörper korreliert jedoch zeitlich nicht mit dem Auftreten erhöhter Viruslast oder dem Nachweis viraler mRNA. Auch eine mögliche Korrelation von viraler Aktivität und einem Anstieg der Antikörpertiter gegen EA und/oder VCA konnte nicht bestätigt werden.

Abbildung 13 A-C zeigt graphisch dargestellt repräsentative Beispiele je eines Patienten nach Nieren- bzw. Stammzelltransplantation und einen gesunden Träger.

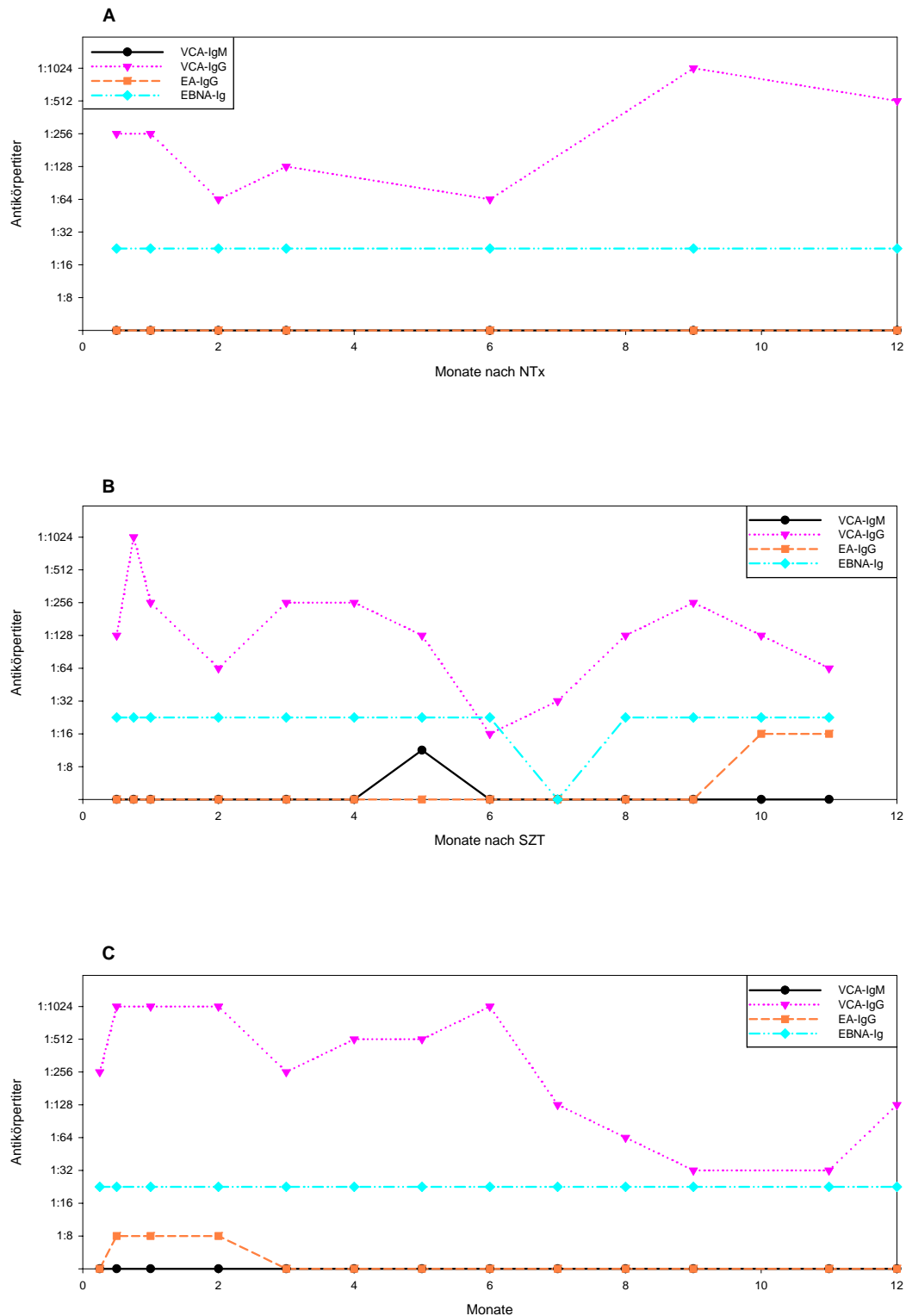


Abbildung 13: EBV-spezifische Antikörper bei
 (A) einem Patienten nach Nierentransplantation
 (B) einem Patienten nach Stammzelltransplantation
 (C) einem gesunden Träger

Dargestellt sind qualitative Ergebnisse für anti-EBNA-Antikörper (◆) und anti-VCA-IgM-Antikörper (●). anti-VCA (▼)- und anti-EA (■)-IgG-Antikörper wurden quantifiziert und sind als Antikörpertiter dargestellt.

3.4.3 Quantifizierung viraler DNA

Die Quantifizierung viraler DNA in Serum und isolierten Lymphozyten erfolgte bei den Patienten nach Nieren bzw. Stammzelltransplantation mit dem System "EBV-DNA". Eine Analyse mit dem hochsensitiven BamHI-System war aufgrund der geringen Menge Blut, die von den Patienten nach Transplantation zur Verfügung stand nicht möglich.

In gesunden Trägern ist mit dieser Methode keine virale DNA in Serum oder PBL nachweisbar. In Immunsupprimierten findet man jedoch in Einzelfällen EBV-DNA im Serum und in 8,8% der Proben in isolierten PBL (Tabelle 12, vgl. Abschnitt 5.2, Tabelle 19)

	SZT 25 Patienten	NTx 22 Patienten	Immunsupprimierte (gesamt)	Gesunde Träger 4 Probanden
Proben (n)	247	149	396	57
DNA _{Serum} (n _{pos.} [%])	4 [1,6%]	0	4 [1,0%]	0
DNA _{PBL} (n _{pos.} [%])	21 [8,5%]	14 [9,4%]	35 [8,8%]	0

Tabelle. 12: Virale DNA in Serum und isolierten PBL bei Patienten nach Transplantation und gesunden Trägern. Die Viruslast lag bei den positiven Proben in der Regel bei 100-1000 Kopien / ml Serum bzw. 10^6 PBL. In 3 Proben bei Patienten nach Stammzelltransplantation lag die Viruslast in PBL bei $1,3 \times 10^3$ - $2,5 \times 10^3$ Kopien / 10^6 PBL

57 Serumproben von 5 ausgewählten Patienten nach Stammzelltransplantation, von denen ausreichend Material zur Verfügung stand, wurden außerdem mit dem hochsensitiven BamHI-System analysiert. In keiner dieser Proben war mit dem herkömmlichen System virale DNA nachweisbar. In 4 der Proben (7,0%) konnten jedoch mit der sensitiveren Methode geringe Mengen EBV-DNA (< 50 Kopien) nachgewiesen werden. In den übrigen Proben war auch mit diesem System keine virale DNA nachweisbar. Dieser Befund stimmt mit den Ergebnissen in gesunden Spendern überein (vgl. Abschnitt 3.2.). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß in immunsupprimierten Patienten nicht generell die lytische Replikation des Virus erhöht ist, sondern es in einzelnen Patienten zu bestimmten Zeitpunkten zu einem Anstieg der Viruslast im Serum kommt.

3.4.4 Expression lytischer und latenter Gene

Bei den gesunden Trägern, die über einen Zeitraum von 12 Monaten untersucht wurden, konnten in 10,5% der Proben BLLF1-Transkripte, jedoch keine anderen lytischen mRNA-Spezies nachgewiesen werden. Bei Immunsupprimierten fand man mit vergleichbarer Häufigkeit Expression von BLLF1. Mit Ausnahme zweier Proben von Patienten nach Stammzelltransplantation, in denen $3,7 \times 10^3$ bzw. $6,9 \times 10^3$ Kopien BLLF1-mRNA / 10^6 PBL nachgewiesen werden konnten, lag die Expression unter 10^3 Kopien / 10^6 PBL. Außerdem fand man bei Patienten nach Transplantation in einzelnen Proben geringe Mengen BZLF1- bzw. BALF5-mRNA (Tabelle 13).

	SZT 25 Patienten	NTx 22 Patienten	Immunsupprimierte (gesamt)	Gesunde Träger 4 Probanden
Proben (n)	247	149	396	57
BZLF1 (n _{pos.} [%])	4 [1,6%]	0	4 [1,0%]	0
BALF5 (n _{pos.} [%])	0	3 [2,0%]	3 [0,8%]	0
BLLF1 (n _{pos.} [%])	32 [13,0%]	20 [13,4%]	52 [13,1%]	6 [10,5%]

Tabelle 13: Expression lytischer viraler Gene bei Patienten nach Transplantation und gesunden Trägern.

Bei den Patienten, von denen ausreichend Material zur Verfügung stand konnte auch die Expression latenter Gene untersucht werden. Im Gegensatz zur Expression lytischer Gene zeigte sich bei den latenten Genen ein deutlicher Unterschied zwischen gesunden Trägern und Patienten unter Immunsuppression (Tabelle 14). EBNA1-Transkripte konnten in Immunsupprimierten zu 100% nachgewiesen werden. Bei der Hälfte der Proben lag die Menge der mRNA bei 100-1000 Kopien / 10^6 PBL, in den anderen Proben konnten bis zu $6,8 \times 10^4$ Kopien / 10^6 PBL nachgewiesen werden. Bei gesunden Trägern konnte EBNA1-mRNA nur in 61,4% der Proben nachgewiesen werden. In über 80% der Proben waren 100-1000 Kopien RNA / 10^6 PBL detektierbar. Die restlichen Proben enthielten maximal $2,9 \times 10^3$ Kopien / 10^6 PBL. EBNA2-Transkripte konnten in nahezu allen Proben von Immunsupprimierten (97,1% bzw. 89,7%; bei

Patienten nach Stammzell- bzw. Nierentransplantation) nachgewiesen werden. In ca. 40% der Proben waren mehr als 10^3 Kopien / 10^6 PBL enthalten (maximale Menge $3,1 \times 10^4$ Kopien / 10^6 PBL. Bei gesunden Spendern waren nur geringe Mengen EBNA2-mRNA (in der Regel $<10^3$ Kopien / 10^6 PBL, in einer Probe $2,6 \times 10^3$ Kopien / 10^6 PBL) in 12,3% der Proben detektierbar. LMP1-mRNA war nur in Einzelfällen bei gesunden Spendern nachweisbar (in zwei Proben $<10^3$ Kopien / 10^6 PBL, in einer Probe $1,7 \times 10^3$ Kopien / 10^6 PBL). Allerdings fand man bei ca. 40% der Proben von Immunsupprimierten Expression von LMP1 (in der Regel $<10^3$ Kopien / 10^6 PBL, in einer Probe $2,1 \times 10^3$ Kopien / 10^6 PBL).

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die latenten Gene in immunsupprimierten Patienten stärker exprimiert sind als in gesunden Trägern. Dabei liegt LMP1-mRNA in der geringsten Konzentration vor. Dies läßt sich entweder durch unterschiedlich starke Expression der verschiedenen viralen mRNAs in latent infizierten Zellen oder durch unterschiedliche Expressionsmuster einzelner infizierter Zellen erklären.

	SZT 15 Patienten	NTx 19 Patienten	Immunsupprimierte (gesamt)	Gesunde Träger 4 Probanden
Proben (n)	69	39	108	57
EBNA1 (n _{pos.} [%])	69 [100%]	39 [100%]	108 [100%]	35 [61,4%]
EBNA2 (n _{pos.} [%])	67 [97,1%]	35 [89,7%]	102 [94,4%]	7 [12,3%]
LMP1 (n _{pos.} [%])	29 [42,0%]	15 [38,5%]	44 [40,7%]	3 [5,3%]

Tabelle 14: Expression latenter viraler Gene bei Patienten nach Transplantation und gesunden Trägern.

Diese Ergebnisse zeigen, daß die zeitweise erhöhte Viruslast bei immunsupprimierten Patienten nicht auf Reaktivierung und lytische Vermehrung des Virus, sondern vielmehr auf eine Vermehrung latent infizierter B-Zellen zurückzuführen ist.

In Tabelle 19 (Abschnitt 5.2) sind die Ergebnisse aller mRNA-Quantifizierungen nochmals zusammengefaßt.

3.4.5 Detektion EBV-spezifischer cytotoxischer T-Zellen

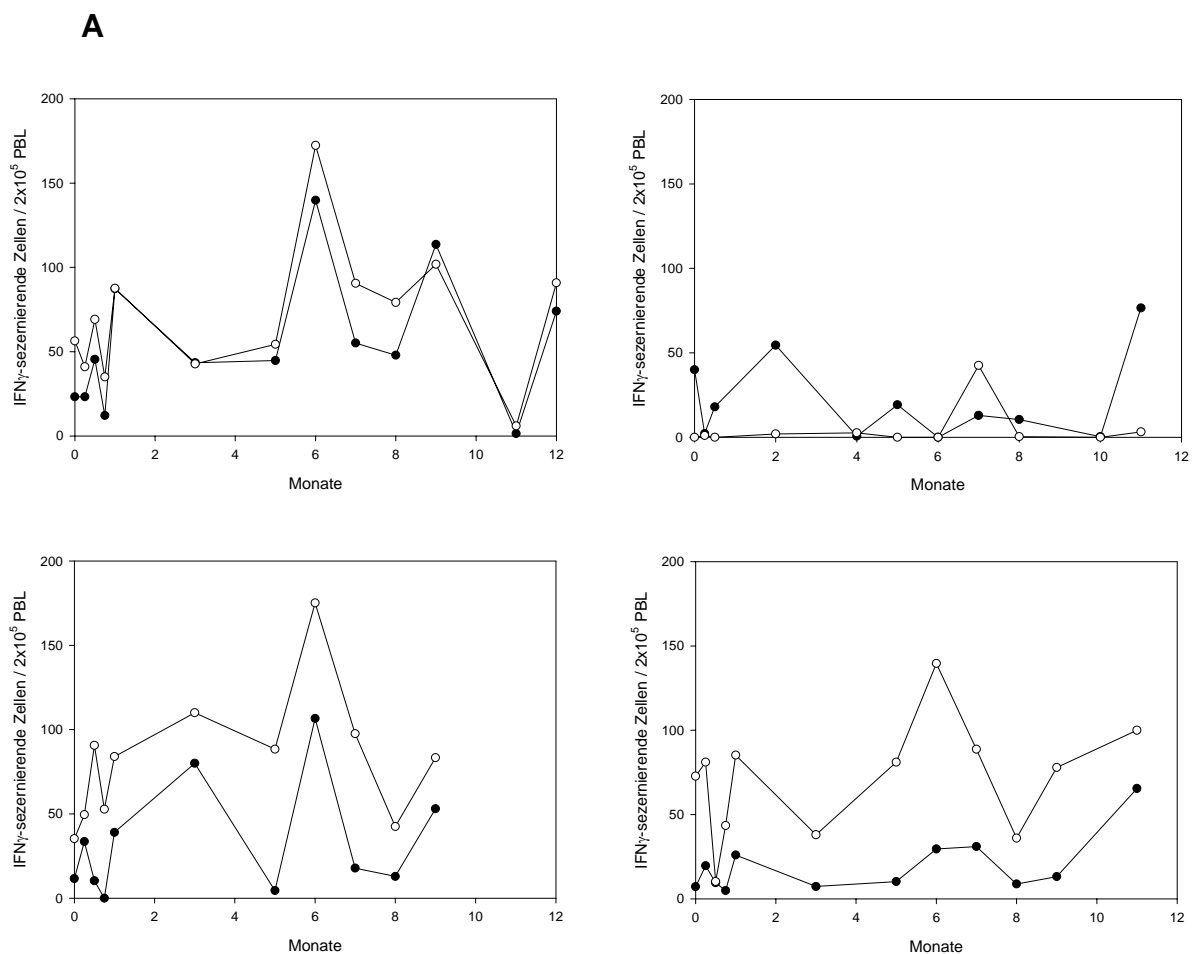
Wie bereits in Abschnitt 1.2.4 beschrieben spielen CD8⁺, cytotoxische T-Zellen (CTL) eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der EBV-Infektion. In gesunden Trägern kontrollieren CTL in der Regel die lytische Vermehrung des Virus soweit, daß es nur in Ausnahmefällen zu einer nachweisbaren Virämie kommt. Außerdem verhindert die immunologische Kontrolle die unkontrollierte Vermehrung latent infizierter B-Zellen und damit lymphoproliferative Erkrankungen. Durch die Immunsuppression werden jedoch die cytotoxischen T-Zellen in ihrer Funktion eingeschränkt. Im Rahmen einer Stammzelltransplantation wird durch die Konditionierung außerdem das periphere Immunsystem des Empfängers zerstört. Bei den Patienten kommt es bis zum Anwachsen des Transplantats zu einer Panzytopenie. Aufgrund der fehlenden Immunkontrolle kann es zu Reaktivierungen des im Transplantat enthaltenen Virus und zu EBV-assoziiierter Lymphoproliferation kommen.

Für einige Proteine des EBV wurden mehrere T-Zell-Epitope beschrieben. Für diese Arbeit wurden zwei gut charakterisierte, HLA-B8-restringierte Epitope aus dem BZLF1-Protein (lytisch) bzw. dem EBNA3A-Protein (latent) ausgewählt. Diese Epitope werden von Personen, die das entsprechende MHC-I-Allel tragen, gut erkannt (Bogedain et al., 1995; Burrows et al., 1990). Bei 4 HLA-B8-positiven Patienten nach Stammzelltransplantation wurden die für diese Epitope spezifischen cytotoxischen T-Zellen über einen Zeitraum von mehreren Monaten quantifiziert. Da diese Patienten durch die Konditionierung ihre "eigene" Immunantwort verlieren und durch die Transplantation ein "neues" Immunsystem erst entstehen muß, ist eine Analyse der T-Zell-vermittelten Immunität vor Ablauf einiger Wochen nach Transplantation nicht sinnvoll und möglich.

Als Kontrollkollektiv dienten 4 gesunde HLA-B8-positive Spender, bei denen spezifische T-Zellen über einen Zeitraum von 10-12 Monaten regelmäßig quantifiziert wurden (Abbildung 14A). Es zeigte sich, daß die Zahl der spezifischen T-Zellen von Spender zu Spender sehr unterschiedlich ist. Bei einem Spender konnten EBNA3A-spezifische CTL nur zu einem Zeitpunkt nachgewiesen werden. Bei allen Spendern schwankte die Zahl der spezifischen T-Zellen stark im zeitlichen Verlauf. Diese Ergebnisse müssen bei der Beurteilung der Situation von Patienten nach Stammzelltransplantation berücksichtigt werden.

Bei allen 4 Patienten nach Transplantation konnten einige Wochen bzw. Monate nach Transplantation EBV-spezifische T-Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 14B). Die Zahl der spezifischen T-Zellen erreichte bei einem Patienten für beide Epitope Werte, die mit gesunden Spendern vergleichbar sind. Bei zwei Patienten konnte eine starke BZLF1-spezifischen Immunantwort nachgewiesen werden, während deutlich weniger EBNA3A-spezifische T-Zellen detektierbar waren. Ein Patient zeigte nur schwache Reaktivitäten gegen beide Epitope, allerdings findet auch bei den gesunden Trägern einzelne Probanden, bei denen die Immunantwort gegen eines oder beide der getesteten Peptide schwach bzw. nicht detektierbar ist.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß es bei Patienten nach Stammzelltransplantation einige Wochen bzw. Monate nach Transplantation zu einer guten Rekonstitution der EBV-spezifischen Immunantwort kommt.



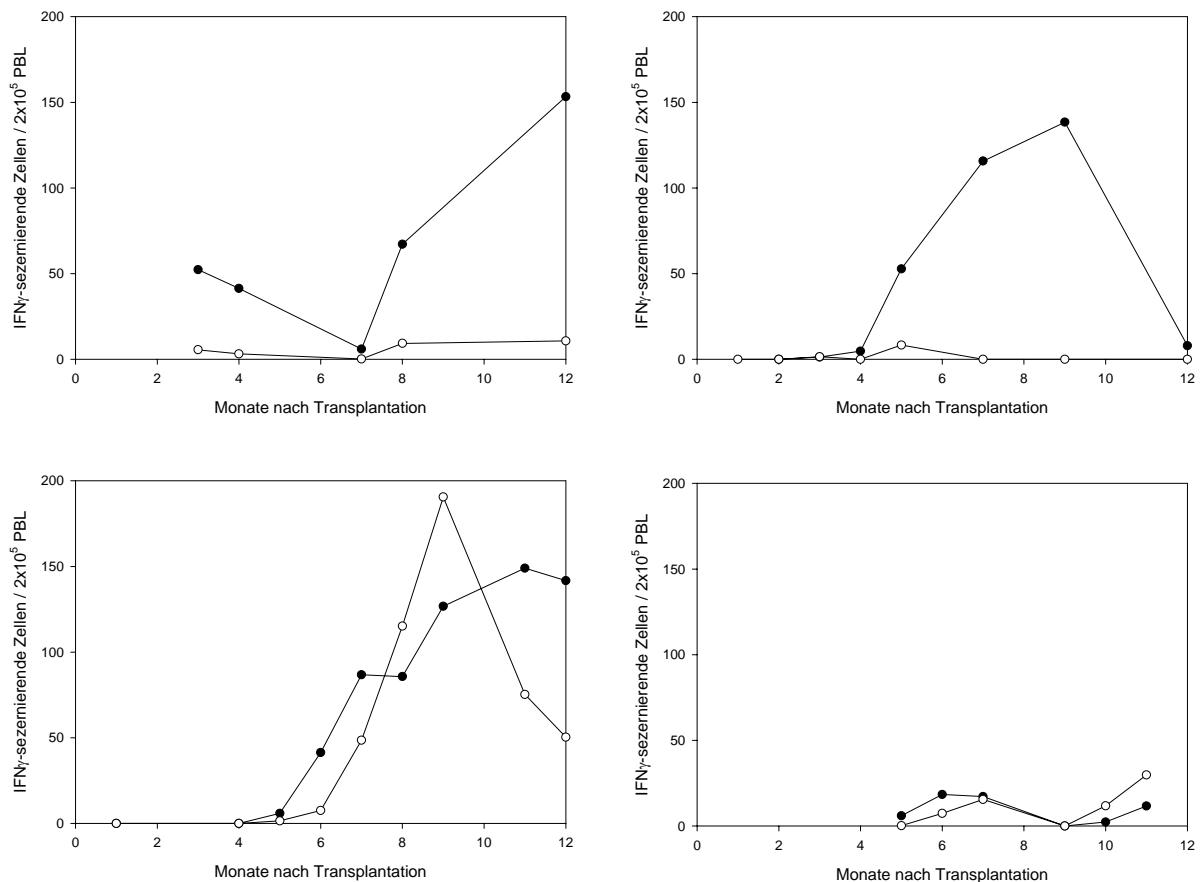
B

Abbildung. 14: EBV-spezifische cytotoxische T-Zellen bei
(A) Patienten nach Stammzelltransplantation
(B) gesunden Spendern

Dargestellt sind spezifisch IFN γ -sezernierende Zellen / 2×10^5 PBL. Stimuliert wurde mit Peptiden aus BZLF1 (—●—) bzw. EBNA3A (—○—). Als Negativkontrolle diente ein irrelevantes HIV-Peptid.

Die zelluläre Immunantwort bei Patienten nach Nierentransplantation wird an unserem Institut im Rahmen eines ReForM-C-Projektes detailliert untersucht. Von den 22 Patienten bei denen Viurslast und virale Expression bestimmt wurden waren 11 auch in dieses Projekt einbezogen. Aus 11 Peptiden wurden die für die HLA-Konstellation des jeweiligen Patienten geeigneten ausgewählt und zur Stimulation in ELISPOT-Assays eingesetzt. Bei allen Patienten zeigte sich ein Rückgang der Reaktivität von spezifischen cytotoxischen T-Zellen im Vergleich zu den Ergebnissen vor Beginn der Immunsuppression. Mit Ausnahme eines Patienten stieg jedoch die Reaktivität in den ersten Monaten nach Transplantation wieder an und stabilisierte sich auf niedrigerem Niveau (Daten nicht gezeigt).

4 Diskussion

4.1 Quantifizierung von EBV-DNA bei Patienten unter Immunsuppression

Die Reaktivierung von Epstein-Barr Virus und das damit verbundene Risiko eine EBV-assoziierte Lymphoproliferation (PTLD) zu entwickeln, stellt für Patienten unter Immunsuppression, besonders nach Transplantationen, eine oftmals tödlich endende Gefahr da. Therapeutische Maßnahmen wie z. B. die Reduktion der Immunsuppression, antivirale Therapie und Infusion von Spender-T-Zellen bei Stammzelltransplantierten greifen meist jedoch nur, wenn sie frühzeitig eingesetzt werden. Eine möglichst schnelle Diagnose ist deshalb für den Erfolg der Behandlung essentiell. Bei einer Reduktion der Immunsuppression besteht allerdings immer die Gefahr einer Abstoßungsreaktion. Eine differenzierte Diagnose, die nicht nur Patienten mit erhöhten EBV-Titern, sondern spezifisch solche mit hohem PTLD-Risiko identifizieren könnte, wäre wünschenswert.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß bei immunsupprimierten Patienten - unabhängig davon ob eine Nieren- oder eine Stammzelltransplantation durchgeführt wurde - im Vergleich zu gesunden Spendern häufiger virale DNA in PBL nachweisbar ist. Im Serum konnte nur in Einzelfällen EBV-DNA detektiert werden. Trotz dieser sporadischen Episoden von viraler Aktivität trat bei keinem der untersuchten 47 Patienten eine EBV-assoziierte Lymphoproliferation auf. In der Regel wurden jedoch nur geringe EBV-Konzentrationen ($<10^3$ Kopien / 10^6 Zellen bzw. ml Serum) nachgewiesen. Lediglich in 3 Proben lag die Konzentration höher ($1,3 \times 10^3$ - $2,5 \times 10^3$ Kopien / 10^6 Zellen). Dies macht deutlich, daß der Nachweis von geringen Mengen EBV-DNA nicht als Marker für ein PTLD-Risiko ausreicht. Vielmehr muß eine kritische Grenze, oberhalb derer ein signifikantes Risiko besteht, definiert werden.

In der Regel wird bei Patienten nach Transplantation in den ersten Monaten die Menge viraler DNA in Serum (Berger et al., 2001), PBL (Baldanti et al., 2000; Kimura et al., 1999) oder Vollblut (Baldanti et al., 2000; Stevens et al., 2001) regelmäßig untersucht. Schon die Auswahl des Ausgangsmaterials beeinflusst allerdings nachhaltig die Aussagekraft der Ergebnisse. Trotz einer Vielzahl von

Studien, die sich mit dem prädiktiven Wert der Viruslast für ein PTLD-Risiko beschäftigen, konnte bisher kein allgemein anwendbares diagnostisches Routine-Verfahren etabliert werden. Dies ist zum einen auf die sehr unterschiedlichen Patientenkollektive (Erwachsene vs. Kinder; Stammzell- vs. Organtransplantation), zum anderen auf die unterschiedlichen Testsysteme und Auswertungsmethoden zurückzuführen. Jede Studie legt mehr oder weniger willkürlich einen Wert für "erhöhte" bzw. "hohe" Virustiter fest. In Anbetracht der vorliegenden Daten läßt sich ein einheitlicher Grenzwert - basierend nur auf der Quantifizierung von EBV-DNA - als prädiktiver Marker für PTLD nur schwer festlegen. Eine Zusammenfassung dieser Problematik wurde von Green und Webber publiziert (Green & Webber, 2002).

Einzelne Studien beschäftigten sich in letzter Zeit mit der Rolle anderer diagnostischer Marker in Kombination mit der Bestimmung der Viruslast als Indikatoren für ein PTLD-Risiko. Allerdings konnten sich weder serologische Marker (Carpentier et al., 2003), T-Zell-Reaktivitäten (Clave et al., 2004), Interleukin-10-Serumlevel (Muti et al., 2003), noch die Analyse einzelner mRNA-Spezies (Qu et al., 2000; Vajro et al., 2000) bisher durchsetzen. Bei der Evaluierung dieser neuen Ansätze muß auch die Durchführbarkeit in der Routine-Diagnostik berücksichtigt werden. Besonders immunologische Ansätze sind oft mit hohem Arbeitsaufwand verbunden und - je nach Methodik - häufig durch HLA-Restriktionen limitiert.

Während einer Lymphoproliferation sind die EBV-Titer deutlich erhöht, wie an einem Patienten nach Stammzelltransplantation gezeigt werden konnte (Abschnitt 3.3.3). Während der Erkrankung wurde eine hohe EBV-Viruslast sowohl in PBL als auch in Plasma detektiert (10^4 - 10^6 Kopien / 10^6 Zellen bzw. ml Serum). Unter antiviraler Therapie, veränderter Immunsuppression und nach Infusion von Spender-T-Zellen kam es aber zur Regression und auch zur Normalisierung der EBV-Titer.

Allerdings wurden auch bei einem anderen Patienten nach Stammzelltransplantation 10^3 - 10^4 Kopien EBV-DNA / 10^6 Zellen bzw. ml Serum detektiert (Abschnitt 3.3.4). In der Folge kam es bei diesem Patienten zu verschiedenen infektiologischen Komplikationen. Es entwickelte sich eine Pneumonie und eine Katheter-assoziierte Infektion. Außerdem wurde eine

Reaktivierung von CMV (Cytomegalovirus) diagnostiziert. Bei diesem Patienten kam es jedoch trotz der erhöhten EBV-Titer nicht zu einer Lymphoproliferation. Eine EBV-Viruslast von 10^3 - 10^4 Kopien / 10^6 Zellen bzw. ml Serum ist also nicht zwingend als Indikator für eine EBV-assoziierte Lymphoproliferation anzusehen. Während einer PTLD sind die EBV-Titer zwar oftmals noch deutlich höher, allerdings ist dann die Lymphoproliferation bereits fortgeschritten, was eine Therapie deutlich erschwert. Wird die EBV-Viruslast als alleiniger Marker für eine EBV-assoziierte Lymphoproliferation herangezogen, wird man abhängig von dem Wert, den man als "kritische Viruslast" definiert, entweder Lymphoproliferationen sehr spät erkennen, oder aber auch Patienten erfassen, bei denen zwar eine erhöhte Viruslast, jedoch keine PTLD auftritt.

Im Interesse einer frühen, eindeutigen Diagnose und sofortiger Therapie ist es notwendig, andere diagnostische Marker in Kombination mit der Bestimmung der Viruslast einzusetzen.

4.2 Qualitative und quantitative Analyse Epstein-Barr-viraler mRNA

Ein möglicher Ansatz, um die virale Aktivität detaillierter zu untersuchen, ist die Analyse von Epstein-Barr-viraler mRNA.

Dies erfolgte in der Vergangenheit in der Regel qualitativ durch RT-PCR (Mundle et al., 2001) und in den meisten Fällen anschließender Hybridisierung mit radioaktiv-markierten Sonden (Edinger et al., 1999; Gonnella et al., 1997; Prang et al., 1997; Xue et al., 2002). Nur in wenigen Arbeiten wurde virale mRNA mittels *real-time* PCR quantifiziert. Dabei wurden jedoch jeweils nur einzelne Transkripte (Germi et al., 2004), nicht jedoch das Expressionsmuster von latenten und lytischen Transkripten untersucht. Die Nachweisgrenzen der verwendeten Systeme variieren bei den verschiedenen Studien stark. Besonders die Menge der für die RNA-Isolierung eingesetzten Zellen spielt dabei eine große Rolle. Bei gesunden Spendern steht in der Regel deutlich mehr Ausgangsmaterial zur Verfügung als z.B. bei immunsupprimierten Patienten.

Bisherige Analysen Epstein-Barr-viraler mRNA bei Patienten nach Organ- oder Stammzelltransplantation zeigten widersprüchliche Ergebnisse. Dies läßt sich zumindest teilweise damit erklären, daß in der Regel nur einzelne, jeweils andere

Transkripte untersucht wurden. Außerdem lassen sich über die Nachweisgrenzen und die Sensitivität qualitativer oder semi-quantitativer Methoden wenig aussagen, was einen direkten Vergleich verschiedener Studien erschwert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden deshalb *real-time* RT-PCR-Systeme für Transkripte, die zu verschiedenen Zeitpunkten während der lytischen Replikation exprimiert werden, (BZLF1, BALF5, BLLF1) und für verschiedene latente Transkripte (EBNA1, EBNA2, LMP1) etabliert. Dies macht die Analyse von Expressionsmustern und - bei erhöhten DNA-Titern in PBL, die durch lytische Vermehrung oder Expansion latent infizierter B-Zellen verursacht werden können - eine Unterscheidung zwischen diesen beiden Szenarien möglich. Da eine Unterscheidung von DNA und RNA anhand der Sequenz bei ungespleißten Transkripten nicht möglich ist, wurde eine Methode zur Isolierung DNA-freier RNA entwickelt. Es ist so möglich auf gleiche Weise weitere PCR-Systeme zur Quantifizierung viraler mRNA zu entwickeln, unabhängig davon, ob die jeweiligen Transkripte gespleißt sind oder nicht. Wie am Beispiel BLLF1 (gp350/220) gezeigt, sind die Mengenverhältnisse von Spleißvarianten oft nicht bekannt bzw. können je nach Situation in der Zelle stark schwanken. Wählt man für die Quantifizierung ein Exon, das allen möglichen Spleißvarianten gemeinsam ist, wird die Gesamtmenge mRNA - unabhängig von Spleißvorgängen - quantifiziert.

Die Verwendung von *in vitro* transkribierter RNA als Eichkurve macht eine absolute Quantifizierung der viralen Transkripte möglich. Für alle Systeme wurde mittels DNA-Eichkurven eine maximale Empfindlichkeit von 1-10 Kopien / well gezeigt. Da die reverse Transkription in der Regel nicht 100% effizient ist, liegt die gezeigte Empfindlichkeit für RNA bei 10-100 Kopien / well, was bei der eingesetzten Menge an PBL 80-800 Kopien / 10^6 Zellen entspricht. Eine weitere Erhöhung der Sensitivität wäre durch den Einsatz größerer Zellzahlen bzw. durch die Anreicherung von B-Zellen denkbar. Dies ist für die Analysen von Zelllinien und zur Charakterisierung von Epstein-Barr Virus in gesunden Trägern durchführbar, es zeigte sich jedoch, daß es kaum möglich ist zusätzlich zu den zu anderen diagnostischen Zwecken durchgeführten Blutentnahmen größere Mengen Blut von immunsupprimierten Patienten oder Patienten mit schweren EBV-assoziierten Erkrankungen zu erhalten.

In der Literatur wurden mehrere Studien, die sich mit der Expression viraler Transkripte beschäftigen, beschrieben.

In einer Studie mit Kindern nach Lebertransplantation wurde neben der Viruslast in PBL auch semiquantitativ die Expression von BZLF1 untersucht (Vajro et al., 2000). Die Autoren wiesen in 66% der untersuchten Patienten zu Beginn der Studie BZLF1-mRNA nach, allerdings bleiben BZLF1-Transkripte nur in 30% der Fälle über den Beobachtungszeitraum hinweg detektierbar. Neben der BZLF1-Expression findet man bei den Patienten dieser Studie auch extrem hohe EBV-Titer in PBL. In fast der Hälfte der Proben wurden mehr als 4×10^5 Kopien / 10^6 PBL detektiert. Die Expression von BZLF1 korreliert dabei mit stark erhöhter Viruslast. Bei allen 4 Patienten, die im Verlauf eine PTLD entwickelten wurde BZLF1 exprimiert, allerdings konnte keine Korrelation zwischen besonders starker BZLF1-Expression und dem Auftreten von PTLD gezeigt werden. Insgesamt lassen sich die Ergebnisse dieser Studie nur schwer auf die Situation in erwachsenen Immunsupprimierten übertragen, bei denen die Infektion mit EBV in der Regel lange zurück liegt. Primärinfektionen mit EBV nach Transplantation, die zu schwerwiegenden Komplikationen führen können, sind bei Erwachsenen extrem selten.

Qu et al. untersuchten die Expression verschiedener latenter Transkripte und BZLF1-mRNA bei Kindern, die unter Immunsuppression nach der Primärinfektion mit EBV persistierend erhöhte EBV-Titer in PBL zeigten (Qu et al., 2000). In dieser Studie wurden nur Patienten untersucht, die über einen Zeitraum von mindestens 3 Monaten Titer von mehr als 200 Kopien / 10^6 PBL aufwiesen. Expression von LMP2a konnte bei nahezu allen Patienten nachgewiesen werden, während LMP1-mRNA - mit einer Ausnahme - nur bei Patienten mit einer Viruslast von mehr als 3000 Kopien / 10^6 PBL detektiert wurde. In einem Fall konnte EBNA1-mRNA, in keinem der Patienten jedoch EBNA2- bzw. BZLF1-Transkripte nachgewiesen werden. Eine genauere Analyse des zeitlichen Verlaufs bei 5 ausgewählten Patienten zeigte jedoch innerhalb der Spender starke Schwankungen bei der Expression von EBNA1 und EBNA2.

Babel et al. konnten die Expression von BALF2-mRNA (frühes Antigen) bei Patienten mit Abstoßungsreaktionen mehr als ein Jahr nach Nierentransplantation zeigen. Allerdings war es nicht möglich BcLF1-mRNA (virales Kapsidantigen) nachzuweisen. Die Autoren schlußfolgern, daß in Fällen ohne CMV-Assoziation

die Abstoßung und damit verbundene Transplantatschäden durch eine abortive lytische Infektion mit EBV verursacht werden (Babel et al., 2001).

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen findet man bei dem hier vorgestellten Kollektiv von gesunden Trägern und Patienten weniger als ein Jahr nach Nieren- bzw. Stammzelltransplantation häufiger mRNA des Strukturproteins gp350/220 als der untersuchten *immediate early* bzw. *early* Gene, was gegen die Theorie einer abortiven lytischen Infektion spricht. Dabei muß berücksichtigt werden, daß andere virale Gene untersucht wurden und sich auch die Zeitpunkte der Analysen nach Transplantation unterscheiden.

Eine der wenigen Arbeiten, bei der virale mRNA mittels *real-time* PCR quantifiziert wurde ist eine Untersuchung zur Expression von BLLF1-mRNA (gp350/220) bei Patienten mit PTLD nach Transplantation (Germi et al., 2004). In dieser Studie konnte BLLF1-mRNA in Biopsien und PBL von Patienten mit PTLD und immunsupprimierten Kindern während der Primärinfektion mit EBV, jedoch nicht in PBL gesunder Träger nachgewiesen werden. Dies stimmt mit den Ergebnissen der hier gezeigten Arbeit überein. Auch wir konnten Expression lytischer viraler Transkripte in Patienten mit PTLD und auch in immunkompetenten Patienten mit Infektiöser Mononukleose zeigen. Der Nachweis von BLLF1-mRNA in ca. 10% der Proben von gesunden Trägern in der hier vorgestellten Arbeit läßt sich mit der größeren Probenanzahl bzw. einer eventuell höheren Sensitivität erklären.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß sich die Expressionsmuster, die man in verschiedenen Patientenkollektiven findet stark unterscheiden. Dies ist sicher zum einen darauf zurückzuführen, daß mit jeweils unterschiedlich sensitiven Methoden jeweils unterschiedliche Transkripte analysiert wurden. Allerdings wird auch deutlich, daß beim Vergleich verschiedener Studien z.B. der Unterschied zwischen Kindern, bei denen vermehrt Primärinfektionen auftreten bzw. diese nicht lange zurückliegen, und Erwachsenen berücksichtigt werden muß. Gravierende Unterschiede in der Viruslast zwischen Kindern und Erwachsenen wurden auch für immunkompetente Spender gezeigt (Maeda et al., 1999).

In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß die Expression viraler lytischer Transkripte bei Immunsupprimierten ohne Symptome einer PTLD im Vergleich zu gesunden Kontrollen nicht wesentlich erhöht ist. In ca. 13% der Proben sind BLLF1-Transkripte detektierbar, andere lytische Transkripte findet man nur in Einzelfällen.

Diese Ergebnisse sprechen dafür, daß es auch unter Immunsuppression bei Patienten ohne EBV-assoziierten Komplikationen nicht häufiger und nicht in stärkerem Ausmaß als bei gesunden Trägern zu Reaktivierungen und lytischer Vermehrung von Epstein-Barr Virus kommt. Im Gegensatz dazu zeigt die Analyse latenter Transkripte eindeutige Unterschiede zwischen Gesunden und Immunsupprimierten. Aufgrund der hier gezeigten Ergebnisse scheint es wahrscheinlich, daß in latent infizierten B-Zellen alle drei getesteten mRNA-Spezies (EBNA1, EBNA2, LMP1) exprimiert werden. Am häufigsten und in der höchsten Konzentration kann EBNA1 nachgewiesen werden. Dies könnte entweder auf eine stärkere Expression dieses Gens in allen infizierten Zellen zurückzuführen sein, oder aber darauf, daß die anderen Gene nicht in allen infizierten Zellen exprimiert werden. Bei Patienten unter Immunsuppression können latente Transkripte häufiger und in höheren Konzentrationen nachgewiesen werden als in gesunden Trägern. Die Expressionsmuster gleichen sich jedoch. Dies läßt darauf schließen, daß unter Immunsuppression mehr latent infizierte B-Zellen zirkulieren, der Phänotyp dieser Zellen jedoch mit dem in gesunden Trägern vergleichbar ist. Es ist also davon auszugehen, daß die erhöhte EBV-Viruslast, die in PBL von Immunsupprimierten nachgewiesen werden konnte, nicht auf eine lytische Vermehrung des Virus, sondern vielmehr auf eine Expansion latent infizierter B-Zellen zurückzuführen ist. Trotz dieser Erhöhung der viralen Aktivität kam es in keinem der 47 Transplantationspatienten zu einer EBV-assoziierten Lymphoproliferation.

4.3 Cytotoxische T-Zellen zur immunologischen Kontrolle von EBV

Wie bereits beschrieben lieferte die Beobachtung, daß in Lymphozytenkulturen EBV-positiver Spender immortalisierte B-Zellen zunächst auswachsen, dann jedoch von zytotoxischen T-Zellen eliminiert werden ("Regression") erste Hinweise, daß diese Zellen bei der immunologischen Kontrolle von EBV eine wichtige Rolle spielen (Misko et al., 1980; Moss et al., 1978; Rickinson et al., 1979). Das Auftreten von EBV-assoziierten lymphoproliferativen Erkrankungen (Craig et al., 1993) und durch virale Replikation verursachte Läsionen (Greenspan et al., 1985) bei Patienten mit verringerter T-Zellaktivität bestätigt diese Rolle

sowohl bei der Primärinfektion als auch während der Latenz (Rickinson & Moss, 1997).

In der Vergangenheit konzentrierte sich die Forschung in erster Linie auf MHC-Klasse I-restringierte CD8⁺ T-Zellen. Während der Primärinfektion kommt es zu einer massiven Expansion EBV-spezifischer CTL, die bis zu 30% der gesamten T-Zellpopulation ausmachen können (Callan et al., 1996). Diese Primärreaktion klingt allerdings rasch wieder ab. Gegen lytische und latente Antigene gerichtete CD8⁺ *memory*-T-Zellen bleiben - in geringer Zahl - jedoch im peripheren Blut detektierbar (Callan, 2004). In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl von CTL-Epitopen in latenten und lytischen Proteinen identifiziert. Eine Übersicht über diese Epitope und deren HLA-Restriktion bietet eine Arbeit von Khanna und Burrows (Khanna & Burrows, 2000).

Die in dieser Arbeit verwendeten ELISPOT-Assays haben gegenüber anderen Methoden zur Analyse spezifischer T-Zellen wie z.B. dem Cr⁵¹-Freisetzungstest und Proliferationsassays den Vorteil, daß spezifische Zellen direkt *ex vivo*, d.h. ohne antigenvermittelte Expansion, auf Einzelzellniveau detektiert werden können. So ist eine direkte Aussage über die Häufigkeit spezifischer Zellen im peripheren Blut möglich. Allerdings ist diese Methode - wie auch die Analyse mit Tetrameren oder der intrazelluläre Nachweis von Zytokinen mittels Durchflußzytometrie - durch die HLA-Restriktion der Epitope limitiert. Es ist notwendig entsprechend der HLA-Konstellation des Blutspenders geeignete Peptide zur Stimulation auszuwählen.

In dieser Arbeit wurden HLA-B8 restringierte, EBV-spezifische CTL bei 4 gesunden Spendern und 4 Patienten nach Stammzelltransplantation über einen Zeitraum von bis zu 12 Monaten analysiert. Dabei zeigte sich, daß bei gesunden Trägern die Zahl der T-Zellen, die für ein bestimmtes Epitop spezifisch sind, stark variieren kann. Außerdem schwankt die Zahl der im peripheren Blut zirkulierenden spezifischen T-Zellen bei den einzelnen Probanden stark im zeitlichen Verlauf. Diese hohe Variabilität muß besonders bei der Interpretation von Ergebnissen bei immunsupprimierten Patienten berücksichtigt werden. Bei allen vier Patienten nach Stammzelltransplantation konnten einige Wochen bzw. Monate nach Transplantation EBV-spezifische T-Zellen nachgewiesen werden. Da durch die Konditionierung das Immunsystem der Stammzell-Empfänger zerstört wird und sich dann das "neue" Immunsystem des Spenders im Empfänger etabliert ist es nicht sinnvoll in diesem Zusammenhang die Zahl der spezifischen T-Zellen vor der

Transplantation mit den Werten nach Transplantation zu vergleichen. Die untersuchten Patienten erreichten einige Wochen bis Monate nach Transplantation jedoch T-Zell-Frequenzen, die innerhalb des weiten Spektrums, das man für gesunde Spender findet, liegen. Dies spricht für eine effiziente Rekonstituierung der Immunantwort nach Stammzelltransplantation. Bei der Mehrzahl der im Rahmen eines ReForM-C-Projektes an unserem Institut untersuchten Patienten nach Nierentransplantation konnte nach Beginn der Immunsuppression ein Rückgang EBV-spezifischer T-Zellen festgestellt werden. Mit einer Ausnahme blieb jedoch auch bei diesen Patienten die zelluläre Immunantwort erhalten.

Diese Ergebnisse machen deutlich, daß auch unter Immunsuppression EBV-spezifische T-Zellen detektiert und mit spezifischen Antigenen stimuliert werden können. Das Immunsystem ist also auch nach Transplantationen in den meisten Fällen in der Lage die virale Aktivität zu kontrollieren und sowohl eine massive lytische Vermehrung als auch EBV-assoziierte Lymphoproliferationen zu verhindern. Bei keinem der prospektiv untersuchten 47 Patienten nach Transplantation kam es zu einer unkontrollierten lytischen Vermehrung des Virus oder zu einer Lymphoproliferation.

4.4 Expressionsmuster lytischer und latenter Transkripte *in vitro* und *in vivo*

Neben der genaueren Analyse viraler Aktivität in Patienten unter Immunsuppression oder bei EBV-assoziierten Erkrankungen können durch die Quantifizierung verschiedener viraler Transkripte auch die viralen Expressionsmuster dargestellt werden und so Fragestellungen zu grundlegenden viralen Mechanismen *in vitro* und *in vivo* beantwortet werden.

Wie auch bei anderen Herpesviren ist die Expression viraler Gene bei Epstein-Barr Virus strikt reguliert. Während der Latenz in ruhenden B-Zellen ist es für das Virus essentiell, daß infizierte Zellen nicht vom Immunsystem erkannt und eliminiert werden. Aus diesem Grund werden während der Latenz in gesunden Trägern nur EBNA1 und LMP2A exprimiert (Rickinson, 1996). Auch in den verschiedenen EBV-assoziierten Tumorarten wird jeweils nur ein Teil der latenten Gene transkribiert. In der Literatur wurden verschiedene Klassifizierungen von

Expressionsmustern postuliert (Thorley-Lawson et al., 1996). Eine Zusammenfassung bietet die Arbeit von Young et al. (Young et al., 2000), auf die bereits Abschnitt 1.2.3. Bezug nimmt. Tabelle 15 zeigt nochmals die dort dargestellten Expressionsmuster latenter viraler Gene.

Bezeichnung	virale Transkripte	Zelltyp
Lat I	EBNA1 EBER1, 2	BL <i>in vivo</i> frühe BL-Passagen
Lat II	EBNA1 LMP1, 2 EBER1, 2 BamHI-A-Transkripte	NPC HD T-Zell-Lymphom
Lat III	EBNA1-3, EBNA-LP LMP1, 2 EBER1, 2 BamHI-A-Transkripte	LCL PTLD späte BL-Passagen

Tabelle 15 :Expressionsmuster latent infizierter Zellen *in vivo* und *in vitro* nach Young et al., 2000. BL=Burkitt-Lymphom, NPC= Nasopharynx-Karzinom, HD= Hodgkin's Disease, LCL= Lymphoblastoide Zelllinien, PTLD= *Post-transplant lymphoproliferative disease*

Bereits hier sieht man, daß von Burkitt-Lymphomen abgeleitete Zelllinien im Verlauf der Kultur ihr virales Expressionsmuster verändern.

In den letzten Jahren gab es vermehrt Hinweise, daß die Expressionsmuster latent infizierter Zellen deutlich variabler sein können als bisher angenommen. Bei diesen Studien wurde auch deutlich, daß die Untersuchung von Biopsiematerial direkt *ex vivo* sich deutlich von den Ergebnissen, die durch Experimente mit Zellkulturmaterial gewonnen wurden, unterscheiden kann.

In der hier vorgestellten Arbeit wurde die Expression lytischer und latenter viraler Gene in verschiedenen Zelllinien untersucht. Dabei zeigte sich, daß in allen Zelllinien (Akata, P3HR₁, Raji, B95-8) ohne chemische Induktion des lytischen Zyklus mRNA aller getesteten Gene exprimiert wird. Die mRNA-Menge unterscheidet sich dabei jedoch stark. Wie erwartet werden die latenten Gene stärker exprimiert, da *in vitro* nur ein kleiner Teil der Zellen in den lytischen Zyklus eintritt. Von den lytischen Transkripten findet man BLLF1 in den höchsten

Konzentrationen. Eine Ausnahme ist dabei die Zelllinie P3HR₁, bei der der Leserahmen des Gens EBNA2 deletiert ist und die entsprechende mRNA nicht exprimiert wird.

Die Expression von BLLF1 wurde auch von Germi et al. bereits mittels *real-time* PCR in verschiedenen Zelllinien analysiert. Im Gegensatz zu den hier gezeigten Ergebnissen konnte in dieser Arbeit in Akata-Zellen ohne chemische Induktion des lytischen Zyklus keine Expression von BLLF1-mRNA nachgewiesen werden. Bei allen drei untersuchten Zelllinien (B95-8, P3HR₁ und Akata) konnte durch die chemische Induktion des lytischen Zyklus die Expression von BLLF1 gesteigert werden. Besonders bei B95-8-Zellen war der Anstieg jedoch nur minimal ($\Delta\log=0,4$). Nach der Induktion konnte in Akata-Zellen BLLF1-mRNA in mit den anderen Zelllinien vergleichbarer Menge detektiert werden (Germi et al., 2004).

Auch Pan et al. untersuchten die Expression viraler Transkripte in B95-8-Zellen. Dazu wurden *real-time* PCR-Systeme für alle durch Computeranalysen postulierte EBV-Gene etabliert. Bei der Analyse von B95-8-Zellen vor und nach chemischer Induktion des lytischen Zyklus zeigt sich, daß die Expression viraler Gene im Rahmen der Induktion nur um einen Faktor 5-20 gesteigert wird (Pan et al., 2005).

Auch bei der Analyse der viralen Expression in Tumoren zeigt sich, daß bei detaillierter Untersuchung verschiedene latente und lytische Transkripte nachgewiesen werden können.

Die Expression von BLLF1 konnte während der Primärinfektion, in Transplantationspatienten mit PTLD und in Biopsien von Nasopharynx-Karzinomen nachgewiesen werden. Weder in gesunden Trägern, noch in Biopsien von Hodgkin-Lymphomen war BLLF1-mRNA nachweisbar (Germi et al., 2004).

Xue et al. zeigten Expression verschiedener latenter und auch lytischer Transkripte in Biopsien von Burkitt-Lymphomen. Neben der erwarteten Expression von EBNA1 in allen Proben, konnten u.a. Transkripte der Gene LMP1, LMP2A, BZLF1 (*immediate early*), BHLF1 (*early*), IR4 (*early*), BARF1 (*early*) und BHRF1 (virales Bcl-2-Homolog) in 50-100% der untersuchten Biopsien nachgewiesen werden (Xue et al., 2002).

Brink et al. konnten in verschiedenen Lymphombiopsien (u.a. Hodgkin-Lymphom, T-NHL, B-NHL) unterschiedliche Expressionsmuster latenter Transkripte nachweisen. Die Expression stimmt dabei im Wesentlichen, jedoch nicht in allen

Fällen, mit den postulierten Expressionsmustern der Latenz II nach Young et al. überein (Brink et al., 1997; Young et al., 2000). Außerdem wurden in Non-Hodkin-Lymphomen in einem Großteil der Biopsien BZLF1-Transkripte detektiert.

Die Analyse viraler mRNA wurde auch in anderen Patientenkollektiven zur Charakterisierung der EBV-Aktivität eingesetzt.

Yoshioka et al. konnten die Expression verschiedener latenter Transkripte in Milzbiopsien von Patienten mit chronisch aktiver EBV-Infektion zeigen. Die Viruslast in verschiedenen Organen dieser Patienten war stark erhöht, Milzbiopsien wurden aufgrund der besonders großen Mengen viraler DNA (10^4 - 10^6 Kopien / μg DNA, entsprechend 4×10^4 - 4×10^6 Kopien / 10^6 Zellen) für die RT-PCR-Analyse ausgewählt. EBNA1 wurden in allen Proben nachgewiesen, EBNA2, LMP1 und LMP2 in unterschiedlichen Konstellationen in einem Teil der Biopsien (Yoshioka et al., 2001).

Diese Ergebnisse machen deutlich, daß die für verschiedene Zelltypen postulierten Expressionsmuster nicht in allen Fällen richtig sind und bei detaillierten Analysen und erhöhter Sensitivität auch andere Konstellationen viraler Expression detektiert werden können.

Es wird davon ausgegangen, daß in ruhenden B-Zellen nur EBNA1 und eventuell LMP2A exprimiert wird. Da das EBNA1-Protein wegen der bereits beschriebenen Glycin-Alanin-Wiederholungssequenz immunologisch nicht erkannt wird, können auf diese Weise latent infizierte B-Zellen unerkant im Körper persistieren. Einige Arbeiten widersprechen jedoch dieser Sichtweise. Tierney et al. konnten bei einem Teil der getesteten gesunden Träger EBNA1- und LMP1-mRNA nachweisen. In dieser Arbeit wurden auch die anderen latenten Transkripte untersucht, konnten jedoch nur während der Primärinfektion, nicht aber bei gesunden Trägern detektiert werden (Tierney et al., 1994). Eine andere Studie untersuchte die Expression von EBNA1 und LMP2A in ruhenden B-Zellen. Dabei konnte nur LMP2A-, nicht jedoch EBNA1-mRNA nachgewiesen werden. Andere Transkripte wurden hier nicht analysiert (Miyashita et al., 1997).

In der hier vorgestellten Arbeit konnten in PBL von gesunden Trägern alle getesteten latenten Transkripte (EBNA1, EBNA2, LMP1) in unterschiedlichen Mengen und Häufigkeiten nachgewiesen werden. Für diesen Befund gibt es theoretisch zwei Erklärungsmöglichkeiten. Zu einen könnte es sein, daß alle Transkripte in allen EBV-positiven Zellen exprimiert werden, schwach exprimierte

mRNA-Spezies jedoch aufgrund der Nachweisgrenze von 100-1000 Kopien / 10^6 Zellen nicht detektiert werden können, da nur 1 von ca. 10^5 B-Zellen (Hsu & Glaser, 2000), also 1 von ca. 10^6 PBL mit EBV infiziert ist. Andererseits ist es auch möglich, daß in der Zirkulation EBV-positive Lymphozyten in unterschiedlichen Stadien der EBV-Infektion vorkommen und in Blutproben ein Gemisch aus B-Zellen mit unterschiedlichen viralen Expressionsmustern analysiert wird. In immunsupprimierten Patienten sind wahrscheinlich mehr B-Zellen latent infiziert. In diesen Patienten findet man größere Mengen EBNA1-mRNA und deutlich häufiger als bei Gesunden auch mRNA der anderen latenten Gene.

Auch frühere Arbeiten zeigten kein einheitliches Muster viraler Expression in gesunden Trägern. So fanden z.B. Gonnella et al. in Zellen des Knochenmarks und in PBL gesunder Spender in einem Teil der Proben EBNA1-, LMP1- und BZLF1-mRNA in unterschiedlichen Konstellationen. Auch bei dieser Arbeit liegt die Vermutung nahe, daß die Methode nicht sensitiv genug war um Transkripte in allen Proben nachzuweisen (Gonnella et al., 1997). Wie in den meisten Studien zur Expression viraler Gene läßt sich jedoch auch hier keine Aussage über die Quantität der mRNA machen. Umso wichtiger erscheint es eine Methode zur Quantifizierung viraler mRNA mittels *real-time* PCR zur Verfügung zu stellen, um Untersuchungen an unterschiedlichen Materialien und Patientenkollektiven vergleichen und evaluieren zu können.

Diese Arbeiten zeigen, daß die Definition von Latenzformen aufgrund unterschiedlicher Expressionsmuster nicht allgemeingültig sein kann. Außerdem wird deutlich, daß sowohl bei gesunden Trägern, als auch in verschiedenen Tumoren auch lytische Transkripte exprimiert werden. Eine hochsensitive Analyse aller latenten und lytischen Transkripte in verschiedenen EBV-assoziierten Erkrankungen und auch bei gesunden Trägern wäre hier notwendig. Dabei muß jedoch berücksichtigt werden, daß wahrscheinlich nicht alle EBV-positiven Zellen einer Biopsie oder Blutprobe ein einheitliches Expressionsmuster besitzen, sondern vielmehr meist ein Gemisch von Zellen in unterschiedlichen Stadien der EBV-Infektion, also auch mit unterschiedlichen Expressionmustern analysiert wird. Eine Analyse auf Einzelzellniveau wäre wünschenswert, ist jedoch -besonders bei Lymphozyten, von denen nur 1 in 10^5 - 10^6 mit EBV infiziert ist- technisch sehr schwierig.

5 Anhang

5.1 Immunsuppression und Konditionierung der Patienten

In Tabelle 16 sind die einzelnen Medikamente, die bei den Patienten nach Nierentransplantation eingesetzt wurden aufgeführt. Die einzelnen Substanzen wurden in unterschiedlichen zeitlichen Intervallen verabreicht und die Dosierung individuell den Patienten und dem klinischen Verlauf angepaßt.

	Calcineurin-Inhibitoren				
Patient	Cyclosporin A	Tacrolimus	Mycophenolat	FTY720	Prednisolon
1	+		+		+
2	+	+	+		+
3				+	+
4	+	+	+		+
5		+	+		+
6			+		+
7		+	+		+
8		+	+		+
9		+	+		+
10		+	+		+
11		+	+		+
12		+	+		+
13		+	+		+
14		+	+		+
15		+	+		+
16		+	+		+
17		+	+		+
18		+	+		+
19	+				+
20		+	+		+
21	+		+		+
22	+		+		+

Tabelle 16: Immunsuppression der einzelnen Patienten nach Nierentransplantation.

In den Tabellen 17 und 18 sind alle Substanzen zusammengestellt, die die Patienten nach Stammzelltransplantation zur Konditionierung bzw. im Verlauf der Therapie zur Immunsuppression erhalten haben. Auch Medikamente, die nur zeitlich begrenzt im Rahmen der Therapie von *Graft-versus-Host*-Episoden eingesetzt wurden sind aufgeführt.

	Konditionierung								
		alkylierende Agentien				Topoisomerase-Hemmer		Synth. Nukleotide	
Patient	TBI	Cyclo-phosphamid	Mephalan	Busulfan	Carmustin	Idarubicin	Amsacrin	Cytarabin	Fludarabin
1	+	+	+				+		+
2			+		+				+
3	+	+							+
4	+	+							+
5	+	+					+	+	+
6	+	+				+		+	+
7	+							+	+
8			+		+				+
9	+							+	+
10	+							+	+
11				+					+
12	+							+	+
13	+							+	+
14	+							+	+
15			+		+				+
16			+		+	+		+	+
17				+					+
18			+		+				+

	Konditionierung								
		alkylierende Agentien				Topoisomerase-Hemmer		Synth. Nukleotide	
Patient	TBI	Cyclo-phosphamid	Mephalan	Busulfan	Carmustin	Idarubicin	Amsacrin	Cytarabin	Fludarabin
19	+							+	
20			+		+				+
21	+		+		+				+
22				+					+
23			+		+	+			+
24	+							+	+
25			+				+	+	+

Tabelle 17. : Konditionierungsschemata der einzelnen Stammzelltransplantationspatienten.

	Immunsuppression										
	Calcineurin- Inhibitoren					Antikörperpräparate				Steroide	
Patient	Cyclosporin A	Tacrolimus	Cytarabin	Methothrexat	Mycophenolat	anti-CD52 (Alemtuzumab)	anti-CD3 (Thymoglobulin)	anti-IL2- Rezeptor (Daclizumab)	Etanercept	Prednisolon	Budesonid
1	+	+	+	+				+	+	+	
2	+		+		+		+			+	
3	+		+	+	+		+			+	
4	+		+	+			+	+	+	+	
5	+		+	+						+	
6	+		+		+		+			+	
7	+		+	+					+	+	+
8	+		+		+		+	+		+	
9	+		+	+						+	
10	+			+		+		+		+	+
11	+			+			+				
12	+	+		+		+	+			+	+
13	+		+			+				+	
14	+					+				+	
15	+				+					+	
16	+		+		+		+			+	

	Immunsuppression										
	Calcineurin- Inhibitoren					Antikörperpräparate				Steroide	
Patient	Cyclosporin A	Tacrolimus	Cytarabin	Methothrexat	Mycophenolat	anti-CD52 (Alemtuzumab)	anti-CD3 (Thymoglobulin)	anti-IL2- Rezeptor (Daclizumab)	Etanercept	Prednisolon	Budesonid
17	+		+	+			+				
18	+				+		+			+	
19	+		+	+			+				
20	+		+		+		+			+	
21	+	+			+					+	
22	+			+			+				
23	+						+			+	
24	+		+	+						+	
25	+	+	+		+		+	+	+	+	+

Tabelle 18: Immunsuppression und Therapie von *Graft-versus-Host*-Episoden der einzelnen Stammzelltransplantationspatienten.

5.2 Serologie, Viruslast und virale Expression bei Patienten nach Transplantation

Tabelle 19 zeigt für alle Patienten nach Nieren- bzw. Stammzelltransplantation und für das Kontrollkollektiv gesunder Virusträger serologische Daten (ELISA und Immunfluoreszenztest), Viruslast in Serum und isolierten Lymphozyten und die Expression latenter und lytischer viraler Gene im zeitlichen Verlauf.

Tabelle 19: Serologische Daten sind qualitativ (+ = positiv; (+) = schwach positiv; +/- = grenzwertig; - = negativ) bzw. im Falle des IFT für anti-VCA-IgM, anti-VCA-IgG und anti-EA-IgG quantitativ als Antikörpertiter angegeben.

DNA- und RNA-Mengen wurden mittels TaqMan-PCR quantifiziert. Im Bereich der Nachweisgrenze war eine Quantifizierung nicht möglich. Schwach positive Proben werden deshalb mit <1000, d.h. 100-1000 Kopien / 10^6 Zellen bzw. ml Serum angegeben. Bei Proben mit höherer DNA- bzw. RNA-Konzentration ist der Wert in Kopien / 10^6 Zellen bzw. ml Serum angegeben. Bei den Zeitpunkten, die in der Tabelle leer dargestellt sind, wurde keine Blutentnahme durchgeführt, bzw. stand nicht ausreichend Material zur Verfügung um auch die latenten Transkripte zu untersuchen.

Patient 1-NTx																	
Zeit nach Transplantation			Wochen				Monate										
			1	2	3	4	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Serologie	ELISA	anti-EA-IgM		–		–	–	–			–			–			–
		anti-EA-IgG		+		(+)	–	+			+/-			–			+/-
		anti-EBNA		+		+	+	+			+			+			+
	IFT	anti-VCA-IgM		–		–	–	–			–			–			–
		anti-VCA-IgG		1:1024		1:512	1:1024	1:1024			1:1024			1:1024			1:512
		anti-EA-IgG		1:16		1:8	–	–			1:128			1:128			1:64
		anti-EBNA		+		+	+	+			+			+			+
	PCR	DNA	Serum		–		–	–	–			–			–		
PBL				–		–	–	–			–			–			–
mRNA		EBNA1															5100
		EBNA2															1400
		LMP1															–
		BZLF1		–		–	–	–			–			–			–
		BALF5		–		–	–	–			–			–			–
		BLLF1		–		<1000	–	–			–			–			–

Patient 2-NTx																	
Zeit nach Transplantation			Wochen				Monate										
			1	2	3	4	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Serologie	ELISA	anti-EA-IgM		–		–	–	–	–		–			–			–
		anti-EA-IgG		–		–	–	–	–		–			–			–
		anti-EBNA		+		+	+	+	+		+			+			+
	IFT	anti-VCA-IgM		–		–	–	–	–		–			–			–
		anti-VCA-IgG		1:256		1:64	1:32	1:32	1:128		1:64			1:1024			1:512
		anti-EA-IgG		–		–	–	–	–		–			–			–
		anti-EBNA		+		+	+	+	+		+			+			+
	PCR	DNA	Serum		–		–	–	–	–		–			–		
PBL				–		–	–	–	–		–			–			–
mRNA		EBNA1												1800			<1000
		EBNA2												3700			<1000
		LMP1												<1000			–
		BZLF1		–		–	–	–	–		–			–			–
		BALF5		–		–	–	–	–		–			–			–
		BLLF1		<1000		<1000	<1000	–	–		–			–			–

Patient 3-NTx																	
Zeit nach Transplantation			Wochen				Monate										
			1	2	3	4	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Serologie	ELISA	anti-EA-IgM	–			–	–	–	–		–			–			–
		anti-EA-IgG	+			–	–	–	–		–			–			–
		anti-EBNA	+			+	+	+	+		+			+			+
	IFT	anti-VCA-IgM	–			–	–	–	–		–			–			–
		anti-VCA-IgG	1:1024			1:1024	1:1024	1:1024	1:1024		1:1024			1:1024			1:1024
		anti-EA-IgG	–			–	–	–	–		–			–			–
		anti-EBNA	+			+	+	+	+		+			+			+
	PCR	DNA	Serum	–			–	–	–	–		–			–		
PBL			–			–	–	–	–		–			–			–
mRNA		EBNA1									<1000			4300			<1000
		EBNA2									<1000			<1000			<1000
		LMP1									<1000			<1000			–
		BZLF1	–			–	–	–	–		–			–			–
		BALF5	–			–	–	–	–		–			–			–
		BLLF1	–			–	–	–	–		<1000			–			–

Patient 4-NTx																
Zeit nach Transplantation			Wochen				Monate									
			1	2	3	4	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Serologie	ELISA	anti-EA-IgM		–		–	–	–								–
		anti-EA-IgG		+		+	+	+								+
		anti-EBNA		+		+	+	+								+
	IFT	anti-VCA-IgM		–		–	–	–								–
		anti-VCA-IgG		1:1024		1:1024	1:512	1:1024								1:512
		anti-EA-IgG		1:8		1:8	–	–								1:32
		anti-EBNA		+		+	+	+								+
	PCR	DNA	Serum		–		–	–	–							
PBL				<1000		–	–	–								–
mRNA		EBNA1														<1000
		EBNA2														1300
		LMP1														–
		BZLF1		–		–	–	–								–
		BALF5		–		–	–	–								–
		BLLF1		–		–	–	–								–

Patient 5-NTx																	
Zeit nach Transplantation			Wochen				Monate										
			1	2	3	4	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Serologie	ELISA	anti-EA-IgM		–		–	–	–	–	–	–						
		anti-EA-IgG		+		+	+	(+)	+		(+)						
		anti-EBNA		+		+	+	+	+		+						
	IFT	anti-VCA-IgM		–		–	–	–	–		–						
		anti-VCA-IgG		1:1024		1:1024	1:1024	1:1024	1:1024		1:256						
		anti-EA-IgG		–		–	–	–	–		–						
		anti-EBNA		+		+	+	+	+		+						
	PCR	DNA	Serum		–		–	–	–	–		–					
PBL				–		–	–	–	–		<1000						
mRNA		EBNA1									<1000						
		EBNA2									2000						
		LMP1									–						
		BZLF1		–		–	–	–	–		–						
		BALF5		–		–	–	–	–		–						
		BLLF1		–		–	–	<1000	–		–						

Patient 6-NTx																
Zeit nach Transplantation			Wochen				Monate									
			1	2	3	4	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Serologie	ELISA	anti-EA-IgM		–		–	–	–								
		anti-EA-IgG		–		–	–	–								
		anti-EBNA		(+)		–	(+)	(+)								
	IFT	anti-VCA-IgM		–		–	–	–								
		anti-VCA-IgG		1:1024		1:1024	1:256	1:256								
		anti-EA-IgG		–		–	–	–								
		anti-EBNA		+		+	+	+								
	PCR	DNA	Serum		–		–	–	–							
PBL				–		–	–	–								
mRNA		EBNA1														
		EBNA2														
		LMP1														
		BZLF1		–		–	–	–								
		BALF5		–		–	–	–								
		BLLF1		<1000		–	–	–								

Patient 7-NTx																
Zeit nach Transplantation			Wochen				Monate									
			1	2	3	4	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Serologie	ELISA	anti-EA-IgM		–	–	–	–	–								
		anti-EA-IgG		–	–	–	–	–								
		anti-EBNA		+	+	+	+	+								
	IFT	anti-VCA-IgM		–	–	–	–	–								
		anti-VCA-IgG		1:1024	1:512	1:256	1:256	1:256								
		anti-EA-IgG		–	–	–	–	–								
		anti-EBNA		+	+	+	+	+								
PCR	DNA	Serum		–	–	–	–	–								
		PBL		–	–	–	<1000	<1000								
	mRNA	EBNA1														
		EBNA2														
		LMP1														
		BZLF1		–	–	–	–	–								
		BALF5		–	–	–	–	–								
		BLLF1		–	<1000	–	–	–								

Patient 8-NTx																	
Zeit nach Transplantation			Wochen				Monate										
			1	2	3	4	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Serologie	ELISA	anti-EA-IgM		–		–	–	–	–								–
		anti-EA-IgG		–		–	–	–	–								–
		anti-EBNA		+		(+)	+	+	+								+
	IFT	anti-VCA-IgM		–		–	–	–	–								–
		anti-VCA-IgG		1:64		1:512	1:128	1:16	1:64								1:128
		anti-EA-IgG		–		–	–	–	–								1:16
		anti-EBNA		+		+	+	+	+								+
	PCR	DNA	Serum		–		–	–	–	–							
PBL				–		–	–	–	–								–
mRNA		EBNA1															<1000
		EBNA2															<1000
		LMP1															–
		BZLF1		–		–	–	–	–								–
		BALF5		–		–	–	–	–								–
		BLLF1		–		–	<1000	–	–								–

Patient 9-NTx																	
Zeit nach Transplantation			Wochen				Monate										
			1	2	3	4	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Serologie	ELISA	anti-EA-IgM		–		–	–	–					–		–		–
		anti-EA-IgG		+		(+)	+	+					+		(+)		+
		anti-EBNA		+		+	+	+					+		+		+
	IFT	anti-VCA-IgM		–		–	–	–					–		–		–
		anti-VCA-IgG		1:1024		1:1024	1:1024	1:1024					1:1024		1:1024		1:1024
		anti-EA-IgG		–		–	–	–					1:16		–		1:32
		anti-EBNA		+		+	+	+					+		+		+
	PCR	DNA	Serum		–		–	–	–					–		–	
PBL				–		–	–	–					<1000		–		–
mRNA		EBNA1											12000		<1000		<1000
		EBNA2											<1000		<1000		–
		LMP1											<1000		<1000		–
		BZLF1		–		–	–	–					–		–		–
		BALF5		–		–	–	–					–		–		–
		BLLF1		–		–	<1000	–					–		–		–

Patient 10-NTx																	
Zeit nach Transplantation			Wochen				Monate										
			1	2	3	4	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Serologie	ELISA	anti-EA-IgM		–		–	–	–	–				–				–
		anti-EA-IgG		–		–	–	–	–				–				–
		anti-EBNA		+		+	+	(+)	+				(+)				+/-
	IFT	anti-VCA-IgM		–		–	–	–	–				–				–
		anti-VCA-IgG		1:32		1:16	1:64	1:16	1:16				1:1024				1:1024
		anti-EA-IgG		–		–	–	–	–				–				–
		anti-EBNA		+		+	+	+	+				+				+
PCR	DNA	Serum		–		–	–	–	–				–				–
		PBL		–		–	–	–	–				–				–
	mRNA	EBNA1															<1000
		EBNA2															<1000
		LMP1															–
		BZLF1		–		–	–	–	–				–				–
		BALF5		–		–	–	–	–				–				–
		BLLF1		<1000		–	–	–	–				–				–

Patient 11-NTx																	
Zeit nach Transplantation			Wochen				Monate										
			1	2	3	4	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Serologie	ELISA	anti-EA-IgM				–	–	–	–		–			–			–
		anti-EA-IgG				–	–	–	–		–			–			–
		anti-EBNA				+	+	+	+		+			+			+
	IFT	anti-VCA-IgM				–	–	–	–		–			–			–
		anti-VCA-IgG				1:1024	1:1024	1:516	1:256		1:1024			1:512			1:1024
		anti-EA-IgG				–	–	–	–		–			–			–
		anti-EBNA				+	+	(+)	+		(+)			–			–
	PCR	DNA	Serum				–	–	–	–		–			–		
PBL						<1000	–	–	–		–			–			–
mRNA		EBNA1									<1000			7500			
		EBNA2									<1000			2000			
		LMP1									–			–			
		BZLF1				–	–	–	–		–			–			–
		BALF5				–	–	<1000	–		–			–			–
		BLLF1				<1000	–	<1000	–		–			–			–

Patient 12-NTx																	
Zeit nach Transplantation			Wochen				Monate										
			1	2	3	4	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Serologie	ELISA	anti-EA-IgM		–		–	–	–	–								–
		anti-EA-IgG		–		–	–	–	–								–
		anti-EBNA		+		+	+	+	+								+
	IFT	anti-VCA-IgM		–		–	–	–	–								–
		anti-VCA-IgG		1:1024		1:1024	1:1024	1:512	1:1024								1:512
		anti-EA-IgG		–		1:32	1:32	1:16	1:128								1:128
		anti-EBNA		+		+	+	+	+								+
	PCR	DNA	Serum		–		–	–	–	–							
PBL				–		–	–	–	–								–
mRNA		EBNA1						<1000	<1000								
		EBNA2						<1000	1200								
		LMP1						–	<1000								
		BZLF1		–		–	–	–	–								–
		BALF5		–		–	–	–	–								–
		BLLF1		–		–	–	–	–								–

Patient 13-NTx																	
Zeit nach Transplantation			Wochen				Monate										
			1	2	3	4	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Serologie	ELISA	anti-EA-IgM	–	–		–	–	–			+			+			
		anti-EA-IgG	–	–		–	–	–			–			–			
		anti-EBNA	+	+		+	+	+			+			+			
	IFT	anti-VCA-IgM	–	–		–	–	–			–			–			
		anti-VCA-IgG	1:1024	1:512		1:512	1:1024	1:1024			1:512			1:1024			
		anti-EA-IgG	–	–		–	–	–			–			–			
		anti-EBNA	+	+		+	+	+			+			+			
PCR	DNA	Serum	–	–		–	–	–			–			–			
		PBL	–	–		–	–	–			–			–			
	mRNA	EBNA1									8800			<1000			
		EBNA2									4600			<1000			
		LMP1									<1000			–			
		BZLF1	–	–		–	–	–			–			–			
		BALF5	–	–		–	–	–			–			–			
		BLLF1	–	–		–	–	–			–			–			

Patient 14-NTx																	
Zeit nach Transplantation			Wochen				Monate										
			1	2	3	4	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Serologie	ELISA	anti-EA-IgM	–	–		–	–	–	–		–			–			–
		anti-EA-IgG	–	–		–	–	–	–		–			–			–
		anti-EBNA	+	+		+	+	+	+		+			+			+
	IFT	anti-VCA-IgM	–	–		–	–	–	–		–			–			–
		anti-VCA-IgG	1:512	1:128		1:32	1:256	1:32	1:16		1:64			–			1:64
		anti-EA-IgG	–	–		–	–	–	–		–			–			–
		anti-EBNA	+	+		+	+	+	+		+			+			+
PCR	DNA	Serum	–	–		–	–	–	–		–			–			–
		PBL	–	–		–	–	–	–		–			–			–
	mRNA	EBNA1									9100			<1000			
		EBNA2									2600			1700			
		LMP1									<1000			<1000			
		BZLF1	–	–		–	–	–	–		–			–			–
		BALF5	–	–		–	–	–	–		–			–			–
		BLLF1	–	–		–	–	–	–		–			–			–

Patient 15-NTx																	
Zeit nach Transplantation			Wochen				Monate										
			1	2	3	4	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Serologie	ELISA	anti-EA-IgM	(+)	(+)		+	+	−						(+)			+
		anti-EA-IgG	+	+		+	+	(+)						(+)			+
		anti-EBNA	+	+		+	+	+						+			+
	IFT	anti-VCA-IgM	−	−		(+)	−	−						−			−
		anti-VCA-IgG	1:1024	1:1024		1:1024	1:1024	1:1024						1:1024			1:1024
		anti-EA-IgG	−	−		−	1:32	1:128						1:16			1:64
		anti-EBNA	+	+		+	+	+						+			+
PCR	DNA	Serum	−	−		−	−	−						−			−
		PBL	<1000	<1000		<1000	−	−						<1000			−
	mRNA	EBNA1												<1000			<1000
		EBNA2												<1000			−
		LMP1												−			−
		BZLF1	−	−		−	−	−						−			−
		BALF5	−	−		<1000	<1000	−						−			−
		BLLF1	<1000	−		−	<1000	<1000						−			−

Patient 16-NTx																	
Zeit nach Transplantation			Wochen				Monate										
			1	2	3	4	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Serologie	ELISA	anti-EA-IgM	–	–		–	–	–			–			–			
		anti-EA-IgG	–	–		–	–	–			–			–			
		anti-EBNA	+	+		+	+	+			+			+			
	IFT	anti-VCA-IgM	–	–		–	–	–			–			–			
		anti-VCA-IgG	1:128	1:256		1:256	1:64	1:64			1:32			1:32			
		anti-EA-IgG	–	–		–	–	1:32			1:32			–			
		anti-EBNA	+	+		+	+	+			+			+			
PCR	DNA	Serum	–	–		–	–	–			–			–			
		PBL	–	–		–	–	–			–			–			
	mRNA	EBNA1									<1000			<1000			
		EBNA2									–			1200			
		LMP1									<1000			–			
		BZLF1	–	–		–	–	–			–			–			
		BALF5	–	–		–	–	–			–			–			
		BLLF1	–	–		–	–	–			–			–			

Patient 17-NTx																	
Zeit nach Transplantation			Wochen				Monate										
			1	2	3	4	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Serologie	ELISA	anti-EA-IgM	–	–		–	–	–	–			–					–
		anti-EA-IgG	–	–		–	–	–	–			–					–
		anti-EBNA	+	+		+	+	+	+			+					+
	IFT	anti-VCA-IgM	–	–		–	–	–	–			–					–
		anti-VCA-IgG	1:512	1:1024		1:1024	1:1024	1:1024	1:1024			1:256					1:1024
		anti-EA-IgG	–	–		–	–	1:16	1:16			–					–
		anti-EBNA	+	+		+	+	+	+			+					+
PCR	DNA	Serum	–	–		–	–	–	–			–					–
		PBL	–	–		<1000	–	–	–			–					–
	mRNA	EBNA1										2800					<1000
		EBNA2										<1000					<1000
		LMP1										<1000					–
		BZLF1	–	–		–	–	–	–			–					–
		BALF5	–	–		–	–	–	–			–					–
		BLLF1	–	–		–	–	–	<1000			<1000					–

Patient 18-NTx																	
Zeit nach Transplantation			Wochen				Monate										
			1	2	3	4	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Serologie	ELISA	anti-EA-IgM	+	+		+	+	+	+		+			+			+
		anti-EA-IgG	–	–		–	–	–	–		–			–			–
		anti-EBNA	+	+		+	+	+	+		+			+			+
	IFT	anti-VCA-IgM	–	–		+/-	–	–	–		–			–			–
		anti-VCA-IgG	1:1024	1:128		1:64	1:128	1:512	1:1024		1:256			1:256			1:1024
		anti-EA-IgG	–	–		–	–	–	–		–			–			–
		anti-EBNA	+	+		+	+	+	+		+			+			+
	PCR	DNA	Serum	–	–		–	–	–	–		–			–		
PBL			–	–		–	–	–	–		–			–			–
mRNA		EBNA1	<1000	<1000		<1000	<1000	<1000			2300			<1000			
		EBNA2	<1000	<1000		6400	<1000	<1000			4800			<1000			
		LMP1	–	–		<1000	–	–			<1000			<1000			
		BZLF1	–	–		–	–	–	–		–			–			–
		BALF5	–	–		–	–	–	–		–			–			–
		BLLF1	–	–		–	–	–	–		–			–			–

Patient 19-NTx																	
Zeit nach Transplantation			Wochen				Monate										
			1	2	3	4	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Serologie	ELISA	anti-EA-IgM	–	–		–	–	–	–		–			–			(+)
		anti-EA-IgG	(+)	+		–	(+)	(+)	(+)		–			–			+/-
		anti-EBNA	–	–		–	–	–	–		–			–			–
	IFT	anti-VCA-IgM	–	–		–	–	–	–		–			–			–
		anti-VCA-IgG	1:512	1:1024		1:1024	1:1024	1:1024	1:256		1:64			1:512			1:512
		anti-EA-IgG	–	–		–	1:16	1:16	1:16		1:16			1:16			–
		anti-EBNA	+	+		+/-	+/-	+/-	+/-		(+)			–			+/-
PCR	DNA	Serum	–	–		–	–	–	–		–			–			–
		PBL	–	–		–	–	–	–		–			–			–
	mRNA	EBNA1									3700			<1000			
		EBNA2									<1000			<1000			
		LMP1									–			–			
		BZLF1	–	–		–	–	–	–		–			–			–
		BALF5	–	–		–	–	–	–		–			–			–
		BLLF1	–	–		<1000	–	–	<1000		–			–			–

Patient 20-NTx																	
Zeit nach Transplantation			Wochen				Monate										
			1	2	3	4	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Serologie	ELISA	anti-EA-IgM	–		–	–		–			–						–
		anti-EA-IgG	–		–	–		–			–						–
		anti-EBNA	+		+	+		+			+						+
	IFT	anti-VCA-IgM	–		–	–		–			–						–
		anti-VCA-IgG	1:512		1:256	1:256		1:256			1:64						1:512
		anti-EA-IgG	–		–	–		–			–						–
		anti-EBNA	+		+	+		+			+						+
PCR	DNA	Serum	–		–	–		–			–						–
		PBL	–		–	–		–			–						–
	mRNA	EBNA1									3700						
		EBNA2									<1000						
		LMP1									<1000						
		BZLF1	–		–	–		–			–						–
		BALF5	–		–	–		–			–						–
		BLLF1	–		–	–		–			–						–

Patient 21-NTx																	
Zeit nach Transplantation			Wochen				Monate										
			1	2	3	4	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Serologie	ELISA	anti-EA-IgM	–	–		–		–	–					–			–
		anti-EA-IgG	–	–		–		–	–					–			–
		anti-EBNA	+	+		+		+	+					+			+
	IFT	anti-VCA-IgM	–	–		–		–	–					–			–
		anti-VCA-IgG	1:16	1:128		1:128		1:256	1:16					1:1024			1:1024
		anti-EA-IgG	–	–		–		–	–					–			–
		anti-EBNA	+	+		+		+	+					+			+
PCR	DNA	Serum	–	–		–		–	–					–			–
		PBL	–	–		–		–	–					–			–
	mRNA	EBNA1						<1000						1500			
		EBNA2						–						<1000			
		LMP1						–						–			
		BZLF1	–	–		–		–	–					–			–
		BALF5	–	–		–		–	–					–			–
		BLLF1	–	–		–		–	–					–			–

Patient 22-NTx																
Zeit nach Transplantation			Wochen				Monate									
			1	2	3	4	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Serologie	ELISA	anti-EA-IgM	–	–		–	–									
		anti-EA-IgG	–	–		–	–									
		anti-EBNA	(+)	(+)		(+)	(+)									
	IFT	anti-VCA-IgM	–	–		–	–									
		anti-VCA-IgG	1:1024	1:256		1:512	1:1024									
		anti-EA-IgG	–	–		–	–									
		anti-EBNA	+	+		+	+									
	PCR	DNA	Serum	–	–		–	–								
PBL			<1000	<1000		<1000	–									
mRNA		EBNA1														
		EBNA2														
		LMP1														
		BZLF1	–	–		–	–									
		BALF5	–	–		–	–									
		BLLF1	–	–		–	–									

Patient 1-SZT																		
Zeit			Wochen				Monate											
			1	2	3	4	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Serologie	ELISA	anti-EA-IgM		–	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–	
		anti-EA-IgG		(+)	+	+	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–	
		anti-EBNA		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	IFT	anti-VCA-IgM		–	–	–	–	–	–	–	–	1:10	–	–	–	–	–	
		anti-VCA-IgG		1:128	1:1024	1:256	1:64	1:256	1:256	1:128	1:16	1:32	1:128	1:256	1:128	1:64		
		anti-EA-IgG		–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1:16	1:16	
		anti-EBNA		+	+	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	
PCR	DNA	Serum		–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–		
		PBL		–	–	–	–	<1000	<1000	–	–	–	–	–	–	–		
	mRNA	EBNA1																
		EBNA2																
		LMP1																
		BZLF1		–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–		
		BALF5		–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–		
		BLLF1		–	–	–	<1000	–	–	–	–	–	–	–	–	–		

Patient 2-SZT																
Zeit			Wochen				Monate									
			1	2	3	4	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Serologie	ELISA	anti-EA-IgM		–	–	–										
		anti-EA-IgG		–	–	–										
		anti-EBNA		+	+	+										
	IFT	anti-VCA-IgM		–	–	–										
		anti-VCA-IgG		1:1024	1:1024	1:1024										
		anti-EA-IgG		–	–	–										
		anti-EBNA		+	+	+										
	PCR	DNA	Serum		–	–	–									
PBL				–	–	–										
mRNA		EBNA1														
		EBNA2														
		LMP1														
		BZLF1		–	–	–										
		BALF5		–	–	–										
		BLLF1		–	–	–										

Patient 3-SZT																		
Zeit			Wochen				Monate											
			1	2	3	4	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Serologie	ELISA	anti-EA-IgM		–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–			
		anti-EA-IgG		–	–	–	–	+	–	–	–	+	+	+	(+)			
		anti-EBNA		+	+	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–		
	IFT	anti-VCA-IgM		–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–			
		anti-VCA-IgG		1:64	1:64	1:32	1:32	1:64	1:32	1:8	1:128	1:128	1:1024	1:512	1:512			
		anti-EA-IgG		–	–	–	–	–		–	–	–	1:32	1:128	1:16			
		anti-EBNA		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
PCR	DNA	Serum		–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	<1000			
		PBL		–	<1000	<1000	–	–	–	–	–	–	<1000	<1000	1300			
	mRNA	EBNA1																
		EBNA2																
		LMP1																
		BZLF1		–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–		
		BALF5		–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–		
		BLLF1		<1000	3700	<1000	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–		

Patient 4-SZT																	
Zeit			Wochen				Monate										
			1	2	3	4	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Serologie	ELISA	anti-EA-IgM		–	–	–	–	–	–	–	–	–	–				
		anti-EA-IgG		–	+	+	(+)	–	–	–	–	–	+				
		anti-EBNA		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
	IFT	anti-VCA-IgM		–	–	–	–	–	–	–	1:10	1:10	1:10				
		anti-VCA-IgG		1:512	1:256	1:128	1:256	1:516	1:128	1:128	1:256	1:512	1:16				
		anti-EA-IgG		–	–	–	–	–	–	–	–	–	–				
		anti-EBNA		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
PCR	DNA	Serum		–	–	–	–	–	–	–	–	–	–				
		PBL		–	–	–	–	–	–	–	<1000	–	<1000				
	mRNA	EBNA1															
		EBNA2															
		LMP1															
		BZLF1		–	–	–	–	–	–	–	–	–	–				
		BALF5		–	–	–	–	–	–	–	–	–	–				
		BLLF1		–	–	–	–	–	–	<1000	–	–	–				

Patient 5-SZT																
Zeit			Wochen				Monate									
			1	2	3	4	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Serologie	ELISA	anti-EA-IgM			–	–	–	–								
		anti-EA-IgG			–	–	–	+								
		anti-EBNA			+	+	+	+								
	IFT	anti-VCA-IgM			–	–	–	–								
		anti-VCA-IgG			1:1024	1:512	1:128	1:64								
		anti-EA-IgG			–	–	–	–								
		anti-EBNA			+	+	+	+								
PCR	DNA	Serum			–	–	–	–								
		PBL			–	–	–	–								
	mRNA	EBNA1														
		EBNA2														
		LMP1														
		BZLF1			–	–	–	–								
		BALF5			–	–	–	–								
		BLLF1			–	–	–	6900								

Patient 6-SZT																	
Zeit			Wochen				Monate										
			1	2	3	4	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Serologie	ELISA	anti-EA-IgM		–	–	–	–	–									
		anti-EA-IgG		+	+	+	–	(+)									
		anti-EBNA		+	+	+	+	+									
	IFT	anti-VCA-IgM		–	–	–	–	–									
		anti-VCA-IgG		1:1024	1:1024	1:256	1:16	1:512									
		anti-EA-IgG		1:8	–	1:8	1:32	–									
		anti-EBNA		+	+	+	+	+									
	PCR	DNA	Serum		–	–	–	–	–								
PBL				–	–	–	–	–									
mRNA		EBNA1															
		EBNA2															
		LMP1															
		BZLF1		–	–	–	–	–									
		BALF5		–	–	–	–	–									
		BLLF1		–	–	–	–	<1000									

Patient 7-SZT																	
Zeit			Wochen				Monate										
			1	2	3	4	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Serologie	ELISA	anti-EA-IgM		–	–	–	–	–	–	–							
		anti-EA-IgG		–	–	–	–	–	–	–							
		anti-EBNA		+	+	+	+	+	+	–							
	IFT	anti-VCA-IgM		–	–	–	–	–	–	–							
		anti-VCA-IgG		1:64	1:32	1:64	1:64	1:64	1:32	–							
		anti-EA-IgG		–	–	–	–	–	–	–							
		anti-EBNA		+	+	+	+	+	+/-	–							
	PCR	DNA	Serum		–	–	–	–	–	–	–						
PBL				–	–	–	–	–	–	–							
mRNA		EBNA1															
		EBNA2															
		LMP1															
		BZLF1		–	–	–	–	–	–	–							
		BALF5		–	–	–	–	–	–	–							
		BLLF1		–	–	–	–	–	<1000	–							

Patient 8-SZT																
Zeit			Wochen				Monate									
			1	2	3	4	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Serologie	ELISA	anti-EA-IgM			–	–										
		anti-EA-IgG			–	–										
		anti-EBNA			+	+										
	IFT	anti-VCA-IgM			–	–										
		anti-VCA-IgG			1:64	1:256										
		anti-EA-IgG			–	–										
		anti-EBNA			+	+										
PCR	DNA	Serum			–	–										
		PBL			–	–										
	mRNA	EBNA1														
		EBNA2														
		LMP1														
		BZLF1			–	–										
		BALF5			–	–										
		BLLF1			–	–										

Patient 9-SZT																	
Zeit			Wochen				Monate										
			1	2	3	4	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Serologie	ELISA	anti-EA-IgM		–	–	–	–	–	–		–	–	–	–	–		–
		anti-EA-IgG		+	+	+	+	+	(+)		–	–	–	–	–		–
		anti-EBNA		+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+		+
	IFT	anti-VCA-IgM		–	–	–	–	–	–		–	–	–	–	–		–
		anti-VCA-IgG		1:1024	1:1024	1:1024	1:1024	1:1024	1:1024		1:1024	1:1024	1:1024	1:1024	1:1024		1:512
		anti-EA-IgG		–	–	–	–	–	–		–	–	1:128	1:128	1:64		1:64
		anti-EBNA		+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+		+
PCR	DNA	Serum		–	–	–	–	–	–		–	–	–	–	<1000		–
		PBL		–	<1000	–	–	–	–		–	–	–	<1000	2200		–
	mRNA	EBNA1													<1000		6600
		EBNA2													<1000		<1000
		LMP1													<1000		<1000
		BZLF1		–	–	–	–	–	–		–	–	–	–	–		–
		BALF5		–	–	–	–	–	–		–	–	–	–	–		–
		BLLF1		<1000	–	–	–	–	<1000		–	–	–	–	–		–

Patient 10-SZT																	
Zeit			Wochen				Monate										
			1	2	3	4	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Serologie	ELISA	anti-EA-IgM		–	–	–	–	–	–								
		anti-EA-IgG		–	–	–	–	–	(+)								
		anti-EBNA		+	+	+	+	+	+								
	IFT	anti-VCA-IgM		–	–	–	–	–	–								
		anti-VCA-IgG		1:128	1:64	1:64	1:512	1:64	1:128								
		anti-EA-IgG		–	–	–	–	–	–								
		anti-EBNA		+	+	+	+	+	+								
	PCR	DNA	Serum		–	–	–	–	–	–							
PBL				–	–	–	–	–	–								
mRNA		EBNA1															
		EBNA2															
		LMP1															
		BZLF1		–	–	–	–	–	–								
		BALF5		–	–	–	–	–	–								
		BLLF1		–	–	–	–	<1000	–								

Patient 11-SZT																	
Zeit			Wochen				Monate										
			1	2	3	4	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Serologie	ELISA	anti-EA-IgM		–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
		anti-EA-IgG		–	–	–	–	–	–	+	+	–	–	–	–	–	–
		anti-EBNA		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	IFT	anti-VCA-IgM		–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
		anti-VCA-IgG		1:1024	1:128	1:64	1:512	1:128	1:512	1:1024	1:256	1:64	1:256	1:128	1:32	1:32	1:64
		anti-EA-IgG		–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
		anti-EBNA		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-
PCR	DNA	Serum		–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
		PBL		–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	mRNA	EBNA1												1100	<1000	24000	68000
		EBNA2												<1000	<1000	3700	1400
		LMP1												<1000	<1000	<1000	–
		BZLF1		–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	<1000
		BALF5		–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
		BLLF1		–	–	–	–	<1000	–	–	–	–	–	–	–	–	–

Patient 12-SZT																	
Zeit			Wochen				Monate										
			1	2	3	4	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Serologie	ELISA	anti-EA-IgM		–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–			–
		anti-EA-IgG		+	(+)	+	+	(+)	–	–	+/-	+	(+)	+			+
		anti-EBNA		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			+
	IFT	anti-VCA-IgM		–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–			–
		anti-VCA-IgG		1:516	1:256	1:64	1:64	1:64	1:256	1:128	1:128	1:128	1:512	1:512			1:128
		anti-EA-IgG		–	–	–	–	–	–	–	–	–	1:16	1:16			1:32
		anti-EBNA		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			+/-
PCR	DNA	Serum		–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–			–
		PBL		–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–			–
	mRNA	EBNA1												<1000			14000
		EBNA2												<1000			13000
		LMP1												<1000			–
		BZLF1		–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–			–
		BALF5		–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–			–
		BLLF1		<1000	–	–	<1000	<1000	<1000	–	–	–	–	–			–

Patient 13-SZT																		
Zeit			Wochen				Monate											
			1	2	3	4	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Serologie	ELISA	anti-EA-IgM		–	–	–	–	–	–	–	–			–	–		–	–
		anti-EA-IgG		–	–	(+)	–	–	–	–			+	–		–	–	
		anti-EBNA		+	+	+	+	+	+	+			(+)	+/-		–	+	
	IFT	anti-VCA-IgM		–	–	–	–	–	–	–			–	–		–	–	
		anti-VCA-IgG		1:64	1:128	1:256	1:32	1:128	1:128	1:64			1:512	1:16		1:32	1:64	
		anti-EA-IgG		–	–	–	–	–	–	–			–	–		–	–	
		anti-EBNA		+	+	+	+	+	+	+			+	(+)		+	+	
	PCR	DNA	Serum		–	–	–	–	–	–	<1000			<1000	–		–	–
PBL				–	–	–	–	–	<1000	<1000			2500	<1000		<1000	–	
mRNA		EBNA1											<1000	17000		8400	11000	
		EBNA2											<1000	1500		2000	1300	
		LMP1											<1000	<1000		<1000	–	
		BZLF1		–	–	–	–	–	–	–			–	–		–	–	
		BALF5		–	–	–	–	–	–	–			–	–		–	–	
		BLLF1		–	<1000	–	<1000	–	<1000	–			–	–		–	–	

Patient 14-SZT																	
Zeit			Wochen				Monate										
			1	2	3	4	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Serologie	ELISA	anti-EA-IgM		–	–	–	–		–	–	–	–		–		–	–
		anti-EA-IgG		+	–	–	+		+	+	(+)	(+)		–		–	–
		anti-EBNA		+	+	+	+		+	+	+	+		+		+	+
	IFT	anti-VCA-IgM		+/-	–	–	–		–	–	–	–		–		–	–
		anti-VCA-IgG		1:1024	1:1024	1:1024	1:1024		1:1024	1:1024	1:1024	1:1024		1:64		1:256	1:512
		anti-EA-IgG		–	–	–	–		1:32	–	1:32	1:32		–		–	1:128
		anti-EBNA		+	+	+	+		+	+	+	+		+		+	+
PCR	DNA	Serum		–	–	–	–		–	–	–	–		–		–	–
		PBL		–	–	–	–		–	–	–	–		–		–	–
	mRNA	EBNA1												14000		4000	5400
		EBNA2												1800		1400	<1000
		LMP1												<1000		<1000	–
		BZLF1		–	–	–	–		–	–	–	–		–		–	–
		BALF5		–	–	–	–		–	–	–	–		–		–	–
		BLLF1		<1000	<1000	<1000	–		–	–	–	–		–		–	–

Patient 15-SZT																	
Zeit			Wochen				Monate										
			1	2	3	4	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Serologie	ELISA	anti-EA-IgM		–	–	–	–	–	–	–	–	–	–		–	–	–
		anti-EA-IgG		+	+	–	–	–	–	–	–	–	+		–	–	–
		anti-EBNA		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+
	IFT	anti-VCA-IgM		–	–	–	–	–	–	–	–	–	–		–	–	–
		anti-VCA-IgG		1:1024	1:1024	1:1024	1:1024	1:256	1:512	1:256	1:128	1:256	1:64		1:128	1:512	1:1024
		anti-EA-IgG		–	–	–	–	–	–	1:16	–	–	–		–	1:16	–
		anti-EBNA		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+
PCR	DNA	Serum		–	–	–	–	–	–	–	–	–	–		–	–	–
		PBL		–	–	–	–	–	–	–	–	–	–		–	–	–
	mRNA	EBNA1											23000		3300	6900	<1000
		EBNA2											<1000		<1000	3000	–
		LMP1											<1000		<1000	–	<1000
		BZLF1		–	–	–	–	–	–	–	–	–	–		–	–	–
		BALF5		–	–	–	–	–	–	–	–	–	–		–	–	–
		BLLF1		<1000	–	–	–	–	–	–	–	–	–		–	–	–

Patient 16-SZT																	
Zeit			Wochen				Monate										
			1	2	3	4	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Serologie	ELISA	anti-EA-IgM		–	–	–	–	–	–	–	–		–	–	–	–	–
		anti-EA-IgG		–	–	–	–	–	–	–	–		–	–	–	–	–
		anti-EBNA		+	+	+	–	–	–	–	–		–	–	–	–	+
	IFT	anti-VCA-IgM		–	–	–	–	–	–	–	–		–	–	–	–	–
		anti-VCA-IgG		–	–	–	–	–	1:64	–	–		–	–	–	1:128	1:128
		anti-EA-IgG		–	–	–	–	–	–	–	–		–	–	–	–	–
		anti-EBNA		+	+	(+)	(+)	+/-	+/-	+/-	+		–	–	–	–	–
PCR	DNA	Serum		–	–	–	–	–	–	–	–		–	–	–	–	–
		PBL		–	–	–	–	–	–	–	–		–	–	–	–	–
	mRNA	EBNA1											17000	20000	10000	8100	<1000
		EBNA2											<1000	<1000	1600	<1000	<1000
		LMP1											<1000	–	<1000	–	<1000
		BZLF1		–	–	–	–	–	–	–	–		–	–	–	–	–
		BALF5		–	–	–	–	–	–	–	–		–	–	–	–	–
BLLF1		–	<1000	–	–	–	–	–	–		–	–	–	–	–		

Patient 17-SZT																	
Zeit			Wochen				Monate										
			1	2	3	4	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Serologie	ELISA	anti-EA-IgM		–	–	–	–	–	–								
		anti-EA-IgG		+	+	–	(+)	(+)	+								
		anti-EBNA		+	+	+	+	+	+								
	IFT	anti-VCA-IgM		–	–	–	–	–	–								
		anti-VCA-IgG		1:1024	1:1024	1:512	1:1024	1:1024	1:1024								
		anti-EA-IgG		–	–	–	–	–	1:16								
		anti-EBNA		+	+	+	+	+	+								
PCR	DNA	Serum		–	–	–	–	–	–								
		PBL		–	–	–	–	–	–								
	mRNA	EBNA1															
		EBNA2															
		LMP1															
		BZLF1		–	–	–	–	–	–								
		BALF5		–	–	–	–	–	–								
		BLLF1		–	–	<1000	–	–	–								

Patient 18-SZT																	
Zeit			Wochen				Monate										
			1	2	3	4	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Serologie	ELISA	anti-EA-IgM		–	–	–	–	–		–	–	–	–	–	–	–	–
		anti-EA-IgG		–	–	+	–	–		–	–	–	+	–	–	–	–
		anti-EBNA		+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+
	IFT	anti-VCA-IgM		–	–	–	–	–		–	–	–	–	–	–	–	–
		anti-VCA-IgG		1:256	1:128	1:256	1:256	1:128		1:64	1:16	1:16	1:16	1:16	1:8	1:128	1:8
		anti-EA-IgG		1:8	–	1:8	1:32	–		–	–	–	–	–	–	–	–
		anti-EBNA		+	+	+	+	+		+	+	+	+	(+)	+	(+)	(+)
PCR	DNA	Serum		–	–	–	–	–		–	–	–	–	–	–	–	–
		PBL		–	–	–	–	–		–	–	–	–	–	–	–	–
	mRNA	EBNA1										<1000	15000	<1000	2000	8500	<1000
		EBNA2										<1000	2200	<1000	<1000	2300	<1000
		LMP1										–	<1000	–	–	–	–
		BZLF1		–	–	–	–	–		–	–	–	–	–	–	–	–
		BALF5		–	–	–	–	–		–	–	–	–	–	–	–	–
		BLLF1		<1000	<1000	–	–	–		–	–	–	–	–	–	–	–

Patient 19-SZT																	
Zeit			Wochen				Monate										
			1	2	3	4	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Serologie	ELISA	anti-EA-IgM			–	–	–	–	–	–	–	–	–		–		–
		anti-EA-IgG			+	(+)	+	+	+	+	+	+	+		+		+
		anti-EBNA			+	+	+	+	(+)	+	+	+	+		+		(+)
	IFT	anti-VCA-IgM			–	–	–	–	–	–	–	–	–		1:10		–
		anti-VCA-IgG			1:512	1:128	1:128	1:512	1:1024	1:1024	1:1024	1:1024	1:512		1:512		1:1024
		anti-EA-IgG			–	–	–	–	1:16	1:64	1:64	1:64	1:16		1:64		–
		anti-EBNA			+	+	+	–	+	+	+	+	+		+		+
PCR	DNA	Serum			–	–	–	–	–	–	–	–	–		–		–
		PBL			–	–	–	–	–	–	–	–	–		–		–
	mRNA	EBNA1										<1000	<1000		5600		<1000
		EBNA2										<1000	<1000		1100		1300
		LMP1										–	–		–		–
		BZLF1			–	–	–	–	–	–	–	–	–		–		–
		BALF5			–	–	–	–	–	–	–	–	–		–		–
		BLLF1			–	<1000	–	–	–	–	–	–	–		–		–

Patient 20-SZT																	
Zeit			Wochen				Monate										
			1	2	3	4	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Serologie	ELISA	anti-EA-IgM		–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–		–	–
		anti-EA-IgG		–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–		+/-	+/-
		anti-EBNA		+	+	+	+	+	–	–	–	–	–	–		–	–
	IFT	anti-VCA-IgM		–	–	–	–	–	–	–	1:10	1:10	1:10	1:10		1:10	1:10
		anti-VCA-IgG		1:1024	1:512	1:512	1:32	1:16	1:64	1:32	1:1024	1:1024	1:1024	1:1024		1:1024	1:1024
		anti-EA-IgG		–	–	–	–	–	–	–	–	1:32	1:128	–		–	1:64
		anti-EBNA		+	+	+	+	+	+	+/-	(+)	(+)	+	+		+	+
PCR	DNA	Serum		–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–		–	–
		PBL		–	–	–	–	–	–	<1000	–	–	–	–		–	–
	mRNA	EBNA1									<1000	<1000	9400	2300		12000	<1000
		EBNA2									<1000	<1000	2400	<1000		3600	<1000
		LMP1									<1000	<1000	–	–		–	–
		BZLF1		–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–		–	–
		BALF5		–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–		–	–
		BLLF1		–	–	–	–	<1000	–	–	–	–	–	–		–	–

Patient 21-SZT																	
Zeit			Wochen				Monate										
			1	2	3	4	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Serologie	ELISA	anti-EA-IgM			–	–	–	–	–		–	–		–	–	–	–
		anti-EA-IgG			–	+	+	–	(+)		+	–		+	+	+	+
		anti-EBNA			+	+	+	+	+		+	+		+	+	+	+
	IFT	anti-VCA-IgM			–	–	–	–	–		–	–		–	–	–	–
		anti-VCA-IgG			1:1024	1:1024	1:1024	1:512	1:128		1:1024	1:1024		1:512	1:1024	1:512	1:1024
		anti-EA-IgG			–	–	–	–	1:16		1:128	1:128		1:64	1:128	1:128	1:128
		anti-EBNA			+	+	+	+	+		+	+		+	+	+	+
PCR	DNA	Serum			–	–	–	–	–		–	–		–	–	–	–
		PBL			–	–	–	–	–		–	–		–	–	–	–
	mRNA	EBNA1									3800	13000		12000	9500	<1000	
		EBNA2									1200	1400		<1000	1100	3700	
		LMP1									–	<1000		<1000	–	–	
		BZLF1			–	–	–	–	–		–	–		–	–	–	<1000
		BALF5			–	–	–	–	–		–	–		–	–	–	–
		BLLF1			–	–	–	–	–		–	–		–	–	–	<1000

Patient 22-SZT																	
Zeit			Wochen				Monate										
			1	2	3	4	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Serologie	ELISA	anti-EA-IgM	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
		anti-EA-IgG	–	–	–	–	–	–	(+)	–	–	–	–	–	–	–	–
		anti-EBNA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	IFT	anti-VCA-IgM	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
		anti-VCA-IgG	1:1024	1:1024	1:1024	1:1024	1:1024	1:1024	1:128	1:128	1:256	1:16	1:256	1:32	1:128	1:128	1:64
		anti-EA-IgG	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
		anti-EBNA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–
PCR	DNA	Serum	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
		PBL	–	–	–	–	–	–	<1000	–	<1000	–	–	–	–	–	–
	mRNA	EBNA1										<1000	1700	8400	5000	<1000	
		EBNA2										<1000	<1000	1100	<1000	4800	
		LMP1										–	–	–	–	–	
		BZLF1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
		BALF5	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
		BLLF1	<1000	<1000	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

Patient 23-SZT																	
Zeit			Wochen				Monate										
			1	2	3	4	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Serologie	ELISA	anti-EA-IgM		–	–	–	–	–	–	–		–	–		–		–
		anti-EA-IgG		–	–	–	+/-	–	–	–		–	+		–		–
		anti-EBNA		+	+	+	+	(+)	+	(+)		–	–		–		–
	IFT	anti-VCA-IgM		–	–	–	–	–	–	–		–	–		–		–
		anti-VCA-IgG		1:1024	1:1024	1:1024	1:1024	1:1024	1:1024	1:1024		1:512	1:1024		1:512		1:512
		anti-EA-IgG		1:8	–	1:8	1:32	–	1:32	–		–	–		–		–
		anti-EBNA		+	+	+	+	+	+	+		(+)	+		+		+
PCR	DNA	Serum		–	–	–	–	–	–	–		–	–		–		–
		PBL		–	–	–	–	–	–	–		–	–		–		–
	mRNA	EBNA1								<1000		23000	7000		8300		<1000
		EBNA2								4500		1700	<1000		1100		2300
		LMP1								–		–	–		–		–
		BZLF1		–	–	–	–	–	–	–		–	–		–		–
		BALF5		–	–	–	–	–	–	–		–	–		–		–
		BLLF1		–	–	–	–	–	–	–		–	–		–		–

Patient 24-SZT																	
Zeit			Wochen				Monate										
			1	2	3	4	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Serologie	ELISA	anti-EA-IgM		–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
		anti-EA-IgG		–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
		anti-EBNA		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	IFT	anti-VCA-IgM		–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
		anti-VCA-IgG		1:128	1:32	1:16	1:16	1:16	1:64	1:16	1:32	1:256	1:128	1:128	1:64	1:128	1:32
		anti-EA-IgG		–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
		anti-EBNA		+	+	+	+	+	+	+	+	(+)	+	+	(+)	+/-	+
PCR	DNA	Serum		–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
		PBL		–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	mRNA	EBNA1			18000	1600	<1000	<1000	19000	17000	1400	3600	<1000				
		EBNA2			1800	3300	<1000	–	1600	<1000	<1000	1200	<1000				
		LMP1			2100	<1000	–	–	<1000	–	–	–	<1000				
		BZLF1		–	<1000	–	–	–	–	–	<1000	–	–	–	–	<1000	–
		BALF5		–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
		BLLF1		–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

Patient 25-SZT																	
Zeit			Wochen				Monate										
			1	2	3	4	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Serologie	ELISA	anti-EA-IgM				–	–	–	–	–							
		anti-EA-IgG				–	–	+/-	–	–							
		anti-EBNA				+	+	+	+	+							
	IFT	anti-VCA-IgM				–	–	–	–	–							
		anti-VCA-IgG				1:1024	1:32	1:256	1:1024	1:64							
		anti-EA-IgG				–	–	1:16	–	–							
		anti-EBNA				+	+	+	+	+							
PCR	DNA	Serum				–	–	–	–	–							
		PBL				–	–	–	–	<1000							
	mRNA	EBNA1				1300	<1000	3500	3500	1600							
		EBNA2				31000	<1000	<1000	<1000	<1000							
		LMP1				<1000	–	–	<1000	<1000							
		BZLF1				–	–	–	–	–							
		BALF5				–	–	–	–	–							
		BLLF1				–	–	–	–	–							

Gesunder Spender 1																	
Zeit			Wochen				Monate										
			1	2	3	4	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Serologie	ELISA	anti-EA-IgM	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
		anti-EA-IgG	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–
		anti-EBNA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	IFT	anti-VCA-IgM	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
		anti-VCA-IgG	1:256	1:1024	1:1024	1:1024	1:1024	1:1024	1:512	1:1024	1:512	1:128	1:128	1:128	1:256	1:128	1:256
		anti-EA-IgG	–	1:8	–	1:8	1:32	–	1:32	–	–	–	–	–	–	–	–
		anti-EBNA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PCR	DNA	Serum	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
		PBL	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	mRNA	EBNA1	<1000	<1000	–	–	–	1700	1700	<1000	<1000	–	–	–	<1000	–	–
		EBNA2	<1000	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
		LMP1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
		BZLF1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
		BALF5	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
		BLLF1	<1000	<1000	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

Gesunder Spender 2																	
Zeit			Wochen				Monate										
			1	2	3	4	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Serologie	ELISA	anti-EA-IgM	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–		–	–	
		anti-EA-IgG	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–		–	–	
		anti-EBNA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	
	IFT	anti-VCA-IgM	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–		–	–	
		anti-VCA-IgG	1:128	1:512	1:512	1:64	1:128	1:128	1:512	1:512	1:128	1:32	1:132		1:32	1:64	
		anti-EA-IgG	–	–	–	1:8	–	–	–	–	–	–	–		–	–	
		anti-EBNA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	
PCR	DNA	Serum	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–		–	–	
		PBL	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–		–	–	
	mRNA	EBNA1	<1000	–	<1000	1300	–	–	<1000	<1000	–	<1000	–		–	–	
		EBNA2	<1000	–	–	<1000	–	–	–	–	–	–	–		–	–	
		LMP1	<1000	–	–	–	–	1700	–	–	–	–	–		–	–	
		BZLF1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–		–	–	
		BALF5	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–		–	–	
		BLLF1	–	–	<1000	–	–	–	–	<1000	–	–	–		–	–	

Gesunder Spender 3																	
Zeit			Wochen				Monate										
			1	2	3	4	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Serologie	ELISA	anti-EA-IgM	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
		anti-EA-IgG	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
		anti-EBNA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	IFT	anti-VCA-IgM	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
		anti-VCA-IgG	1:256	1:1024	1:1024	1:1024	1:1024	1:256	1:512	1:512	1:1024	1:128	1:64	1:32	1:512	1:32	1:128
		anti-EA-IgG	–	1:8	1:8	1:8	1:8	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
		anti-EBNA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PCR	DNA	Serum	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
		PBL	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	mRNA	EBNA1	<1000	–	<1000	<1000	<1000	<1000	2900	<1000	<1000	<1000	<1000	–	1500	<1000	–
		EBNA2	–	–	<1000	<1000	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
		LMP1	–	<1000	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
		BZLF1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
		BALF5	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
		BLLF1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

Gesunder Spender 4																	
Zeit			Wochen				Monate										
			1	2	3	4	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Serologie	ELISA	anti-EA-IgM	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–		–
		anti-EA-IgG	–	–	–	–	+	–	–	–	+	–	–	–	–		–
		anti-EBNA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+
	IFT	anti-VCA-IgM	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–		–
		anti-VCA-IgG	1:1024	1:1024	1:1024	1:1024	1:1024	1:1024	1:512	1:1024	1:1024	1:1024	1:64	1:512	1:1024		1:1024
		anti-EA-IgG	1:16	1:8	–	1:32	1:128	–	1:32	1:128	1:128	–	1:8	–	–		1:8
		anti-EBNA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+
PCR	DNA	Serum	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–		–
		PBL	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–		–
	mRNA	EBNA1	<1000	–	<1000	<1000	–	1700	<1000	–	<1000	–	<1000	<1000	<1000		<1000
		EBNA2	–	–	–	–	–	–	–	–	2600	–	–	–	<1000		–
		LMP1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–		–
		BZLF1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–		–
		BALF5	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–		–
		BLLF1	–	–	–	<1000	–	–	–	–	–	–	–	–	<1000		–

Literaturverzeichnis

Amon, W. and Farrell, P. J. (2005). Reactivation of Epstein-Barr virus from latency. *Rev Med Virol* 15 (3): 149-156.

Amyes, E., Hatton, C., Montamat-Sicotte, D., Gudgeon, N., Rickinson, A. B., McMichael, A. J. et al. (2003). Characterization of the CD4+ T cell response to Epstein-Barr virus during primary and persistent infection. *J Exp Med* 198 (6): 903-911.

Anagnostopoulos, I., Hummel, M., Kreschel, C., and Stein, H. (1995). Morphology, immunophenotype, and distribution of latently and/or productively Epstein-Barr virus-infected cells in acute infectious mononucleosis: implications for the interindividual infection route of Epstein-Barr virus. *Blood* 85 (3): 744-750.

Aversa, F., Tabilio, A., Terenzi, A., Velardi, A., Falzetti, F., Giannoni, C. et al. (1994). Successful engraftment of T-cell-depleted haploidentical "three-loci" incompatible transplants in leukemia patients by addition of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood progenitor cells to bone marrow inoculum. *Blood* 84 (11): 3948-3955.

Babel, N., Schwarzmann, F., Prang, N., Jaeger, M., Wolf, H., Kern, F. et al. (2001). Association between Epstein-Barr virus infection and late acute transplant rejection in long-term transplant patients. *Transplantation* 72 (4): 736-739.

Baer, R., Bankier, A. T., Biggin, M. D., Deininger, P. L., Farrell, P. J., Gibson, T. J. et al. (1984). DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. *Nature* 310 (5974): 207-211.

Baldanti, F., Grossi, P., Furione, M., Simoncini, L., Sarasini, A., Comoli, P. et al. (2000). High levels of Epstein-Barr virus DNA in blood of solid-organ transplant recipients and their value in predicting posttransplant lymphoproliferative disorders. *J Clin Microbiol* 38 (2): 613-619.

Bayliss, G. J. and Wolf, H. (1981). An Epstein-Barr virus early protein induces cell fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78 (11): 7162-7165.

Beisel, C., Tanner, J., Matsuo, T., Thorley-Lawson, D., Kezdy, F., and Kieff, E. (1985). Two major outer envelope glycoproteins of Epstein-Barr virus are encoded by the same gene. *J Virol* 54 (3): 665-674.

Bejarano, M. T. and Masucci, M. G. (1998). Interleukin-10 abrogates the inhibition of Epstein-Barr virus-induced B-cell transformation by memory T-cell responses. *Blood* 92 (11): 4256-4262.

Berger, C., Day, P., Meier, G., Zingg, W., Bossart, W., and Nadal, D. (2001). Dynamics of Epstein-Barr virus DNA levels in serum during EBV-associated disease. *J Med Virol* 64 (4): 505-512.

Biggin, M., Farrell, P. J., and Barrell, B. G. (1984). Transcription and DNA sequence of the BamHI L fragment of B95-8 Epstein-Barr virus. *EMBO J* 3 (5): 1083-1090.

Bogedain, C., Wolf, H., Modrow, S., Stuber, G., and Jilg, W. (1995). Specific cytotoxic T lymphocytes recognize the immediate-early transactivator Zta of Epstein-Barr virus. *J Virol* 69 (8): 4872-4879.

- Bonnet, M., Guinebreiere, J. M., Kremmer, E., Grunewald, V., Benhamou, E., Contesso, G. et al. (1999). Detection of Epstein-Barr virus in invasive breast cancers. *J Natl Cancer Inst* 91 (16): 1376-1381.
- Böhler, T., Waiser, J., Budde, K., and Neumayer, H. H. (1998). SDZ RAD und FTY 720: Zukunftsperspektiven in der Transplantationsimmunologie. *innovartis* 4: 20-24.
- Brink, A. A., Oudejans, J. J., Jiwa, M., Walboomers, J. M., Meijer, C. J., and van den Brule, A. J. (1997). Multiprimered cDNA synthesis followed by PCR is the most suitable method for Epstein-Barr virus transcript analysis in small lymphoma biopsies. *Mol Cell Probes* 11 (1): 39-47.
- Burns, D. M. and Crawford, D. H. (2004). Epstein-Barr virus-specific cytotoxic T-lymphocytes for adoptive immunotherapy of post-transplant lymphoproliferative disease. *Blood Rev* 18 (3): 193-209.
- Burrows, S. R., Sculley, T. B., Misko, I. S., Schmidt, C., and Moss, D. J. (1990). An Epstein-Barr virus-specific cytotoxic T cell epitope in EBV nuclear antigen 3 (EBNA 3). *J Exp Med* 171 (1): 345-349.
- Callan, M. F. (2004). The immune response to Epstein-Barr virus. *Microbes Infect* 6 (10): 937-945.
- Callan, M. F., Steven, N., Krausa, P., Wilson, J. D., Moss, P. A., Gillespie, G. M. et al. (1996). Large clonal expansions of CD8+ T cells in acute infectious mononucleosis. *Nat Med* 2 (8): 906-911.
- Callan, M. F., Tan, L., Annels, N., Ogg, G. S., Wilson, J. D., O'Callaghan, C. A. et al. (1998). Direct visualization of antigen-specific CD8+ T cells during the primary immune response to Epstein-Barr virus In vivo. *J Exp Med* 187 (9): 1395-1402.
- Carel, J. C., Myones, B. L., Frazier, B., and Holers, V. M. (1990). Structural requirements for C3d,g/Epstein-Barr virus receptor (CR2/CD21) ligand binding, internalization, and viral infection. *J Biol Chem* 265 (21): 12293-12299.
- Carpentier, L., Tapiero, B., Alvarez, F., Viau, C., and Alfieri, C. (2003). Epstein-Barr virus (EBV) early-antigen serologic testing in conjunction with peripheral blood EBV DNA load as a marker for risk of posttransplantation lymphoproliferative disease. *J Infect Dis* 188 (12): 1853-1864.
- Chang, R. S., Lewis, J. P., and Abildgaard, C. F. (1973). Prevalence of oropharyngeal excretors of leukocyte-transforming agents among a human population. *N Engl J Med* 289 (25): 1325-1329.
- Chapman, A. L. and Rickinson, A. B. (1998). Epstein-Barr virus in Hodgkin's disease. *Ann Oncol* 9 Suppl 5: S5-16.
- Clave, E., Agbalika, F., Bajzik, V., de Latour, R. P., Trillard, M., Rabian, C. et al. (2004). Epstein-Barr virus (EBV) reactivation in allogeneic stem-cell transplantation: relationship between viral load, EBV-specific T-cell reconstitution and rituximab therapy. *Transplantation* 77 (1): 76-84.
- Colby, B. M., Shaw, J. E., Elion, G. B., and Pagano, J. S. (1980). Effect of acyclovir [9-(2-hydroxyethoxymethyl)guanine] on Epstein-Barr virus DNA replication. *J Virol* 34 (2): 560-568.
- Craig, F. E., Gulley, M. L., and Banks, P. M. (1993). Posttransplantation lymphoproliferative disorders. *Am J Clin Pathol* 99 (3): 265-276.

- Curtis, R. E., Travis, L. B., Rowlings, P. A., Socie, G., Kingma, D. W., Banks, P. M. et al. (1999). Risk of lymphoproliferative disorders after bone marrow transplantation: a multi-institutional study. *Blood* 94 (7): 2208-2216.
- Dales, S. and Chardonnet, Y. (1973). Early events in the interaction of adenoviruses with HeLa cells. Association with microtubules and the nuclear pore complex during vectorial movement of the inoculum. *Virology* 56 (2): 465-483.
- Davis, J. E. and Moss, D. J. (2004). Treatment options for post-transplant lymphoproliferative disorder and other Epstein-Barr virus-associated malignancies. *Tissue Antigens* 63 (4): 285-292.
- Decker, L. L., Klamman, L. D., and Thorley-Lawson, D. A. (1996). Detection of the latent form of Epstein-Barr virus DNA in the peripheral blood of healthy individuals. *J Virol* 70 (5): 3286-3289.
- Delecluse, H. J., Bartnizke, S., Hammerschmidt, W., Bullerdiek, J., and Bornkamm, G. W. (1993). Episomal and integrated copies of Epstein-Barr virus coexist in Burkitt lymphoma cell lines. *J Virol* 67 (3): 1292-1299.
- Dilworth, D. D. and McCarrey, J. R. (1992). Single-step elimination of contaminating DNA prior to reverse transcriptase PCR. *PCR Methods Appl* 1 (4): 279-282.
- Edinger, J. W., Bonneville, M., Scotet, E., Houssaint, E., Schumacher, H. R., and Posnett, D. N. (1999). EBV gene expression not altered in rheumatoid synovia despite the presence of EBV antigen-specific T cell clones. *J Immunol* 162 (6): 3694-3701.
- Epstein, J. B., Sherlock, C. H., and Greenspan, J. S. (1991). Hairy leukoplakia-like lesions following bone-marrow transplantation. *AIDS* 5 (1): 101-102.
- Epstein, M. A., Achong, B. G., and Barr, Y. M. (1964). Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma. *Lancet* 15: 702-703.
- Faulkner, G. C., Burrows, S. R., Khanna, R., Moss, D. J., Bird, A. G., and Crawford, D. H. (1999). X-Linked agammaglobulinemia patients are not infected with Epstein-Barr virus: implications for the biology of the virus. *J Virol* 73 (2): 1555-1564.
- Gerber, P., Lucas, S., Nonoyama, M., Perlin, E., and Goldstein, L. I. (1972). Oral excretion of Epstein-Barr virus by healthy subjects and patients with infectious mononucleosis. *Lancet* 2 (7785): 988-989.
- Germi, R., Morand, P., Brengel-Pesce, K., Fafi-Kremer, S., Genoulaz, O., Ginevra, C. et al. (2004). Quantification of gp350/220 Epstein-Barr virus (EBV) mRNA by real-time reverse transcription-PCR in EBV-associated diseases. *Clin Chem* 50 (10): 1814-1817.
- Gonnella, R., Angeloni, A., Calogero, A., Farina, A., Santarelli, R., Gentile, G. et al. (1997). Transcription of latent and replicative Epstein-Barr-virus genes in bone-marrow and peripheral-blood mononuclear cells of healthy donors. *Int J Cancer* 70 (5): 524-529.
- Green, M. and Webber, S. A. (2002). EBV viral load monitoring: unanswered questions. *Am J Transplant* 2 (10): 894-895.
- Greenspan, J. S., Greenspan, D., Lennette, E. T., Abrams, D. I., Conant, M. A., Petersen, V. et al. (1985). Replication of Epstein-Barr virus within the epithelial cells of oral "hairy" leukoplakia, an AIDS-associated lesion. *N Engl J Med* 313 (25): 1564-1571.

- Gregory, C. D., Rowe, M., and Rickinson, A. B. (1990). Different Epstein-Barr virus-B cell interactions in phenotypically distinct clones of a Burkitt's lymphoma cell line. *J Gen Virol* 71 (Pt 7): 1481-1495.
- Haddad, E., Paczesny, S., Leblond, V., Seigneurin, J. M., Stern, M., Achkar, A. et al. (2001). Treatment of B-lymphoproliferative disorder with a monoclonal anti-interleukin-6 antibody in 12 patients: a multicenter phase 1-2 clinical trial. *Blood* 97 (6): 1590-1597.
- Hariharan, S., Johnson, C. P., Bresnahan, B. A., Taranto, S. E., McIntosh, M. J., and Stablein, D. (2000). Improved graft survival after renal transplantation in the United States, 1988 to 1996. *N Engl J Med* 342 (9): 605-612.
- Harris, N. L., Jaffe, E. S., Diebold, J., Flandrin, G., Muller-Hermelink, H. K., Vardiman, J. et al. (2000). The World Health Organization classification of neoplasms of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting--Airlie House, Virginia, November, 1997. *Hematol J* 1 (1): 53-66.
- Hebart, H. and Einsele, H. (2004). Specific infectious complications after stem cell transplantation. *Support Care Cancer* 12 (2): 80-85.
- Helderman, J. H., Bennett, W. M., Cibrik, D. M., Kaufman, D. B., Klein, A., and Takemoto, S. K. (2003). Immunosuppression: practice and trends. *Am J Transplant* 3 Suppl 4: 41-52.
- Henderson, B. E., Louie, E., SooHoo-Jing, J., Buell, P., and Gardner, M. B. (1976). Risk factors associated with nasopharyngeal carcinoma. *N Engl J Med* 295 (20): 1101-1106.
- Henle, G. and Henle, W. (1966). Immunofluorescence in cells derived from Burkitt's lymphoma. *J Bacteriol* 91 (3): 1248-1256.
- Henle, G., Henle, W., and Diehl, V. (1968). Relation of Burkitt's tumor-associated herpes-yppe virus to infectious mononucleosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 59 (1): 94-101.
- Henle, W. and Henle, G. (1981). Epstein-Barr virus-specific serology in immunologically compromised individuals. *Cancer Res* 41 (11 Pt 1): 4222-4225.
- Hornef, M. W., Bein, G., Fricke, L., Steinhoff, J., Wagner, H. J., Hinderer, W. et al. (1995). Coincidence of Epstein-Barr virus reactivation, cytomegalovirus infection, and rejection episodes in renal transplant recipients. *Transplantation* 60 (5): 474-480.
- Hsu, J. L. and Glaser, S. L. (2000). Epstein-barr virus-associated malignancies: epidemiologic patterns and etiologic implications. *Crit Rev Oncol Hematol* 34 (1): 27-53.
- Huang, Y. T., Sheen, T. S., Chen, C. L., Lu, J., Chang, Y., Chen, J. Y. et al. (1999). Profile of cytokine expression in nasopharyngeal carcinomas: a distinct expression of interleukin 1 in tumor and CD4+ T cells. *Cancer Res* 59 (7): 1599-1605.
- Hummel, M., Thorley-Lawson, D., and Kieff, E. (1984). An Epstein-Barr virus DNA fragment encodes messages for the two major envelope glycoproteins (gp350/300 and gp220/200). *J Virol* 49 (2): 413-417.
- Hurley, E. A., Agger, S., McNeil, J. A., Lawrence, J. B., Calendar, A., Lenoir, G. et al. (1991). When Epstein-Barr virus persistently infects B-cell lines, it frequently integrates. *J Virol* 65 (3): 1245-1254.

- Jenkins, D., DiFrancesco, L., Chaudhry, A., Morris, D., Gluck, S., Jones, A. et al. (2002). Successful treatment of post-transplant lymphoproliferative disorder in autologous blood stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant* 30 (5): 321-326.
- Kaden, J., Petersen, S., Kaden, K., and May, G. (1998). Epstein-Barr virus infection after kidney transplantation. *Transpl Int* 11 Suppl 1: S119-S124.
- Kahan, B. D., Kirken, R. A., and Stepkowski, S. M. (2003). New approaches to transplant immunosuppression. *Transplant Proc* 35 (5): 1621-1623.
- Karajannis, M. A., Hummel, M., Anagnostopoulos, I., and Stein, H. (1997). Strict lymphotropism of Epstein-Barr virus during acute infectious mononucleosis in nonimmunocompromised individuals. *Blood* 89 (8): 2856-2862.
- Kaufman, D. B., Shapiro, R., Lucey, M. R., Cherikh, W. S., Bustami, R., and Dyke, D. B. (2004). Immunosuppression: practice and trends. *Am J Transplant* 4 Suppl 9: 38-53.
- Khanna, R. and Burrows, S. R. (2000). Role of cytotoxic T lymphocytes in Epstein-Barr virus-associated diseases. *Annu Rev Microbiol* 54:19-48.
- Khyatti, M., Patel, P. C., Stefanescu, I., and Menezes, J. (1991). Epstein-Barr virus (EBV) glycoprotein gp350 expressed on transfected cells resistant to natural killer cell activity serves as a target antigen for EBV-specific antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J Virol* 65 (2): 996-1001.
- Kieff, E. and Rickinson, A. B. (2001). Epstein-Barr virus and its replication. in: *Fields Virology* 4, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia: 2511-2573.
- Kimura, H., Morita, M., Yabuta, Y., Kuzushima, K., Kato, K., Kojima, S. et al. (1999). Quantitative analysis of Epstein-Barr virus load by using a real-time PCR assay. *J Clin Microbiol* 37 (1): 132-136.
- Knerr, I., Schuster, S., Nomikos, P., Buchfelder, M., Dotsch, J., Schoof, E. et al. (2001). Gene expression of adrenomedullin, leptin, their receptors and neuropeptide Y in hormone-secreting and non-functioning pituitary adenomas, meningiomas and malignant intracranial tumours in humans. *Neuropathol Appl Neurobiol* 27 (3): 215-222.
- Kopp, J. B. and Klotman, P. E. (1990). Cellular and molecular mechanisms of cyclosporin nephrotoxicity. *J Am Soc Nephrol* 1 (2): 162-179.
- Lenoir, G., Philip, T., and Sohier, R. (1994). Burkitt-type lymphoma: EBV association and cytogenetic markers in cases from various geographic locations. in: *Pathogenesis of leukemias and lymphomas: environmental influences*, Raven Press, New York: p. 283
- Levine, P. and Hildesheim, A. (1991). The epidemiology of nasopharyngeal carcinoma: past, present and future. in: *Epstein-Barr virus and human disease*, Humana Press, New York: 317-324.
- Levitskaya, J., Sharipo, A., Leonchiks, A., Ciechanover, A., and Masucci, M. G. (1997). Inhibition of ubiquitin/proteasome-dependent protein degradation by the Gly-Ala repeat domain of the Epstein-Barr virus nuclear antigen 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (23): 12616-12621.
- Li, Q., Turk, S. M., and Hutt-Fletcher, L. M. (1995). The Epstein-Barr virus (EBV) BZLF2 gene product associates with the gH and gL homologs of EBV and carries an epitope critical to infection of B cells but not of epithelial cells. *J Virol* 69 (7): 3987-3994.

- Loren, A. W., Porter, D. L., Stadtmauer, E. A., and Tsai, D. E. (2003). Post-transplant lymphoproliferative disorder: a review. *Bone Marrow Transplant* 31 (3): 145-155.
- Lyons, S. F. and Liebowitz, D. N. (1998). The roles of human viruses in the pathogenesis of lymphoma. *Semin Oncol* 25 (4): 461-475.
- Maeda, A., Wakiguchi, H., Yokoyama, W., Hisakawa, H., Tomoda, T., and Kurashige, T. (1999). Persistently high Epstein-Barr virus (EBV) loads in peripheral blood lymphocytes from patients with chronic active EBV infection. *J Infect Dis* 179 (4): 1012-1015.
- Maini, M. K., Gudgeon, N., Wedderburn, L. R., Rickinson, A. B., and Beverley, P. C. (2000). Clonal expansions in acute EBV infection are detectable in the CD8 and not the CD4 subset and persist with a variable CD45 phenotype. *J Immunol* 165 (10): 5729-5737.
- Masucci, M. G. and Ernberg, I. (1994). Epstein-Barr virus: adaptation to a life within the immune system. *Trends Microbiol* 2 (4): 125-130.
- Matsuo, T., Heller, M., Petti, L., O'Shiro, E., and Kieff, E. (1984). Persistence of the entire Epstein-Barr virus genome integrated into human lymphocyte DNA. *Science* 226 (4680): 1322-1325.
- Miller, L. W. (2002). Cardiovascular toxicities of immunosuppressive agents. *Am J Transplant* 2 (9): 807-818.
- Misko, I. S., Moss, D. J., and Pope, J. H. (1980). HLA antigen-related restriction of T lymphocyte cytotoxicity to Epstein-Barr virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77 (7): 4247-4250.
- Miyashita, E. M., Yang, B., Babcock, G. J., and Thorley-Lawson, D. A. (1997). Identification of the site of Epstein-Barr virus persistence in vivo as a resting B cell. *J Virol* 71 (7): 4882-4891.
- Miyashita, E. M., Yang, B., Lam, K. M., Crawford, D. H., and Thorley-Lawson, D. A. (1995). A novel form of Epstein-Barr virus latency in normal B cells in vivo. *Cell* 80 (4): 593-601.
- Mocarski, E. S. and Courcelle, C. T. (2001). Cytomegaloviruses and their replication. in: *Fields Virology* 2, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia: 2629-2673.
- Molesworth, S. J., Lake, C. M., Borza, C. M., Turk, S. M., and Hutt-Fletcher, L. M. (2000). Epstein-Barr virus gH is essential for penetration of B cells but also plays a role in attachment of virus to epithelial cells. *J Virol* 74 (14): 6324-6332.
- Moss, D. J., Rickinson, A. B., and Pope, J. H. (1978). Long-term T-cell-mediated immunity to Epstein-Barr virus in man. I. Complete regression of virus-induced transformation in cultures of seropositive donor leukocytes. *Int J Cancer* 22 (6): 662-668.
- Mundle, S., Allampallam, K., Aftab-Rashid, K., Dangerfield, B., Cartlidge, J., Zeitler, D. et al. (2001). Presence of activation-related m-RNA for EBV and CMV in the bone marrow of patients with myelodysplastic syndromes. *Cancer Lett* 164 (2): 197-205.
- Muti, G., Klersy, C., Baldanti, F., Granata, S., Oreste, P., Pezzetti, L. et al. (2003). Epstein-Barr virus (EBV) load and interleukin-10 in EBV-positive and EBV-negative post-transplant lymphoproliferative disorders. *Br J Haematol* 122 (6): 927-933.

- National Cancer Institute sponsored study of classifications of non-Hodkin's lymphomas: summary and description of a working formulation for clinical usage. The Non-Hodgkins's Lymphoma Pathologic Classification Project. (1982). *Cancer* 49: 2112-2135.
- Nemerow, G. R. and Cooper, N. R. (1984). Early events in the infection of human B lymphocytes by Epstein-Barr virus: the internalization process. *Virology* 132 (1): 186-198.
- Neumayer H. H. (2001). *Neue Medikamente in der Transplantationsmedizin*, International Medical Publishers, London
- Nichols, W. G. (2003). Management of infectious complications in the hematopoietic stem cell transplant recipient. *J Intensive Care Med* 18 (6): 295-312.
- Niedobitek, G., Agathangelou, A., Rowe, M., Jones, E. L., Jones, D. B., Turyaguma, P. et al. (1995). Heterogeneous expression of Epstein-Barr virus latent proteins in endemic Burkitt's lymphoma. *Blood* 86 (2): 659-665.
- Northrop, J. P., Crabtree, G. R., and Mattila, P. S. (1992). Negative regulation of interleukin 2 transcription by the glucocorticoid receptor. *J Exp Med* 175 (5): 1235-1245.
- Pan, Y. R., Fang, C. Y., Chang, Y. S., and Chang, H. Y. (2005). Analysis of Epstein-Barr virus gene expression upon phorbol ester and hydroxyurea treatment by real-time quantitative PCR. *Arch Virol* 150 (4): 755-770.
- Papadopoulos, E. B., Ladanyi, M., Emanuel, D., Mackinnon, S., Boulad, F., Carabasi, M. H. et al. (1994). Infusions of donor leukocytes to treat Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders after allogeneic bone marrow transplantation. *N Engl J Med* 330 (17): 1185-1191.
- Patel, R. (2001). Infections in recipients of kidney transplants. *Infect Dis Clin North Am* 15 (3): 901-52,xi.
- Patel, R. and Paya, C. V. (1997). Infections in solid-organ transplant recipients. *Clin Microbiol Rev* 10 (1): 86-124.
- Pedersen, C., Gerstoft, J., Lundgren, J. D., Skinhoj, P., Bottzauw, J., Geisler, C. et al. (1991). HIV-associated lymphoma: histopathology and association with Epstein-Barr virus genome related to clinical, immunological and prognostic features. *Eur J Cancer* 27 (11): 1416-1423.
- Pober, J. S. and Cotran, R. S. (1990). The role of endothelial cells in inflammation. *Transplantation* 50 (4): 537-544.
- Poirier, S., Bouvier, G., Malaveille, C., Ohshima, H., Shao, Y. M., Hubert, A. et al. (1989). Volatile nitrosamine levels and genotoxicity of food samples from high-risk areas for nasopharyngeal carcinoma before and after nitrosation. *Int J Cancer* 44 (6): 1088-1094.
- Prang, N. S., Hornef, M. W., Jager, M., Wagner, H. J., Wolf, H., and Schwarzmann, F. M. (1997). Lytic replication of Epstein-Barr virus in the peripheral blood: analysis of viral gene expression in B lymphocytes during infectious mononucleosis and in the normal carrier state. *Blood* 89 (5): 1665-1677.
- Purtilo, D. T. (1991). X-linked lymphoproliferative disease (XLP) as a model of Epstein-Barr virus-induced immunopathology. *Springer Semin Immunopathol* 13 (2): 181-197.

- Qu, L., Green, M., Webber, S., Reyes, J., Ellis, D., and Rowe, D. (2000). Epstein-Barr virus gene expression in the peripheral blood of transplant recipients with persistent circulating virus loads. *J Infect Dis* 182 (4): 1013-1021.
- Rickinson, A. B. and Kieff, E. (1996). Epstein-Barr virus. in: *Virology* third, Lippincott-Raven, Philadelphia: 2397-2446.
- Rickinson, A. B. and Moss, D. J. (1997). Human cytotoxic T lymphocyte responses to Epstein-Barr virus infection. *Annu Rev Immunol* 15:405-31-31.
- Rickinson, A. B., Moss, D. J., and Pope, J. H. (1979). Long-term T-cell-mediated immunity to Epstein-Barr virus in man. II. Components necessary for regression in virus-infected leukocyte cultures. *Int J Cancer* 23 (5): 610-617.
- Roizman, B. and Knipe, D. M. (2001). Herpes simplex viruses and their replication. in: *Fields Virology* 2, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia: 2399-2459.
- Rooney, C. M., Rowe, D. T., Ragot, T., and Farrell, P. J. (1989). The spliced BZLF1 gene of Epstein-Barr virus (EBV) transactivates an early EBV promoter and induces the virus productive cycle. *J Virol* 63 (7): 3109-3116.
- Rowe, D. T. (1999). Epstein-Barr virus immortalization and latency. *Front Biosci* 4: D346-D371.
- Rowe, M., Lear, A. L., Croom-Carter, D., Davies, A. H., and Rickinson, A. B. (1992). Three pathways of Epstein-Barr virus gene activation from EBNA1-positive latency in B lymphocytes. *J Virol* 66 (1): 122-131.
- Sayegh, M. H. and Carpenter, C. B. (2004). Transplantation 50 years later--progress, challenges, and promises. *N Engl J Med* 351 (26): 2761-2766.
- Schmelzle, T. and Hall, M. N. (2000). TOR, a central controller of cell growth. *Cell* 103 (2): 253-262.
- Seipelt, G. (1998). Chronische myeloische Leukämie. in: *Leukämitherapie* 1, UNI-MED Verlag, Bremen: 14-21.
- Shapiro, R. S., McClain, K., Frizzera, G., Gajl-Peczalska, K. J., Kersey, J. H., Blazar, B. R. et al. (1988). Epstein-Barr virus associated B cell lymphoproliferative disorders following bone marrow transplantation. *Blood* 71 (5): 1234-1243.
- Shibata, D. and Weiss, L. M. (1992). Epstein-Barr virus-associated gastric adenocarcinoma. *Am J Pathol* 140 (4): 769-774.
- Sia, I. G. and Patel, R. (2000). New strategies for prevention and therapy of cytomegalovirus infection and disease in solid-organ transplant recipients. *Clin Microbiol Rev* 13 (1): 83-121,table.
- Simon, D. M. and Levin, S. (2001). Infectious complications of solid organ transplantations. *Infect Dis Clin North Am* 15 (2): 521-549.
- Simons, M. J., Wee, G. B., Goh, E. H., Chan, S. H., Shanmugaratnam, K., Day, N. E. et al. (1976). Immunogenetic aspects of nasopharyngeal carcinoma. IV. Increased risk in Chinese of nasopharyngeal carcinoma associated with a Chinese-related HLA profile (A2, Singapore 2). *J Natl Cancer Inst* 57 (5): 977-980.

- Sixbey, J. W., Nedrud, J. G., Raab-Traub, N., Hanes, R. A., and Pagano, J. S. (1984). Epstein-Barr virus replication in oropharyngeal epithelial cells. *N Engl J Med* 310 (19): 1225-1230.
- Stansfeld, A. G., Diebold, J., Noel, H., Kapanci, Y., Rilke, F., Kelenyi, G. et al. (1988). Updated Kiel classification for lymphomas. *Lancet* 1 (8580): 292-293.
- Stevens, S. J., Verschuuren, E. A., Pronk, I., Der-Bij, W., Harmsen, M. C., The, T. H. et al. (2001). Frequent monitoring of Epstein-Barr virus DNA load in unfractionated whole blood is essential for early detection of posttransplant lymphoproliferative disease in high-risk patients. *Blood* 97 (5): 1165-1171.
- Straus, S. E. (1988). The chronic mononucleosis syndrome. *J Infect Dis* 157 (3): 405-412.
- Straus, S. E., Cohen, J. I., Tosato, G., and Meier, J. (1993). NIH conference. Epstein-Barr virus infections: biology, pathogenesis, and management. *Ann Intern Med* 118 (1): 45-58.
- Sugawara, Y., Mizugaki, Y., Uchida, T., Torii, T., Imai, S., Makuuchi, M. et al. (1999). Detection of Epstein-Barr virus (EBV) in hepatocellular carcinoma tissue: a novel EBV latency characterized by the absence of EBV-encoded small RNA expression. *Virology* 256 (2): 196-202.
- Sullivan, J. L. and Woda, B. A. (1989). X-linked lymphoproliferative syndrome. *Immunodef Rev* 1 (4): 325-347.
- Tanner, J., Weis, J., Fearon, D., Whang, Y., and Kieff, E. (1987). Epstein-Barr virus gp350/220 binding to the B lymphocyte C3d receptor mediates adsorption, capping, and endocytosis. *Cell* 50 (2): 203-213.
- Tao, Q., Srivastava, G., Chan, A. C., Chung, L. P., Loke, S. L., and Ho, F. C. (1995). Evidence for lytic infection by Epstein-Barr virus in mucosal lymphocytes instead of nasopharyngeal epithelial cells in normal individuals. *J Med Virol* 45 (1): 71-77.
- Terasaki, P. I., Cecka, J. M., Gjertson, D. W., and Takemoto, S. (1995). High survival rates of kidney transplants from spousal and living unrelated donors. *N Engl J Med* 333 (6): 333-336.
- Thompson, M. P. and Kurzrock, R. (2004). Epstein-Barr virus and cancer. *Clin Cancer Res* 10 (3): 803-821.
- Thorley-Lawson, D. A., Miyashita, E. M., and Khan, G. (1996). Epstein-Barr virus and the B cell: that's all it takes. *Trends Microbiol* 4 (5): 204-208.
- Tierney, R. J., Steven, N., Young, L. S., and Rickinson, A. B. (1994). Epstein-Barr virus latency in blood mononuclear cells: analysis of viral gene transcription during primary infection and in the carrier state. *J Virol* 68 (11): 7374-7385.
- Tokunaga, M., Land, C. E., Uemura, Y., Tokudome, T., Tanaka, S., and Sato, E. (1993). Epstein-Barr virus in gastric carcinoma. *Am J Pathol* 143 (5): 1250-1254.
- Trpkov, K., Marcussen, N., Rayner, D., Lam, G., and Solez, K. (1997). Kidney allograft with a lymphocytic infiltrate: acute rejection, posttransplantation lymphoproliferative disorder, neither, or both entities? *Am J Kidney Dis* 30 (3): 449-454.

Vajro, P., Lucariello, S., Migliaro, F., Sokal, E., Gridelli, B., Vegnente, A. et al. (2000). Predictive value of Epstein-Barr virus genome copy number and BZLF1 expression in blood lymphocytes of transplant recipients at risk for lymphoproliferative disease. *J Infect Dis* 181 (6): 2050-2054.

Vincenti, F. (2003). Immunosuppression minimization: current and future trends in transplant immunosuppression. *J Am Soc Nephrol* 14 (7): 1940-1948.

Wang, X., Kenyon, W. J., Li, Q., Mullberg, J., and Hutt-Fletcher, L. M. (1998). Epstein-Barr virus uses different complexes of glycoproteins gH and gL to infect B lymphocytes and epithelial cells. *J Virol* 72 (7): 5552-5558.

Xue, S. A., Labrecque, L. G., Lu, Q. L., Ong, S. K., Lampert, I. A., Kazembe, P. et al. (2002). Promiscuous expression of Epstein-Barr virus genes in Burkitt's lymphoma from the central African country Malawi. *Int J Cancer* 99 (5): 635-643.

Yoshioka, M., Ishiguro, N., Ishiko, H., Ma, X., Kikuta, H., and Kobayashi, K. (2001). Heterogeneous, restricted patterns of Epstein-Barr virus (EBV) latent gene expression in patients with chronic active EBV infection. *J Gen Virol* 82 (Pt 10): 2385-2392.

Young, L. S., Dawson, C. W., and Eliopoulos, A. G. (2000). The expression and function of Epstein-Barr virus encoded latent genes. *Mol Pathol* 53 (5): 238-247.

Young, L. S. and Rickinson, A. B. (2004). Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat Rev Cancer* 4 (10): 757-768.

Eigene Arbeiten

Vorträge und Poster

Raab U, **Bauer B**, Gigler A, Beckenlehner K, Wolf H, Modrow S
Identification of cellular transcription factors interacting with p6 promoter elements and the NS1-protein of parvovirus B19
Posterpräsentation, Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Wien, 26.-29. April 2000

Bauer B, Weinberger KM, Jilg W
Quantification of BZLF1 mRNA for monitoring of EBV reactivation.
Vortrag, Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Erlangen, 08.-11. April 2002

Bauer B, Weinberger KM, Jilg W; Quantification of BZLF1 mRNA for monitoring of EBV reactivation.
Posterpräsentation, European conference on viral diseases (ConVir), München, 10.-12. Mai 2002

Bauer B, Weinberger KM, Jilg W
Quantification of BZLF1, BALF5 and BLLF1 mRNA for monitoring of EBV reactivation.
Posterpräsentation, Biennial meeting of the international association for research on EBV, Cairns, Australien, 16.-21. Juli 2002

Bauer B, Bauer T, Püllmann K, Jilg W, Wolf H, Deml L
Induction of MHC class-I and -II restricted Epitope Presentation by urea-treated BZLF1 protein: A novel technology for the detection of protein-specific cytotoxic T-cells
Vortrag, Biennial meeting of the international association for research on EBV, Cairns, Australien, 16.-21. Juli 2002

Bauer B, Weinberger KM, Jilg W
Quantification of viral mRNA for monitoring of EBV reactivation.
Posterpräsentation International Herpesvirus Workshop, Cairns, Australien, 20.-26. Juli 2002

Bauer B, Jilg W
Analyse EBV-spezifischer virologischer und immunologischer Parameter bei Patienten unter Immunsuppression: Bedeutung der EBV-Infektion für den klinischen Verlauf
Vortrag, BMBF-Meeting, Reissensburg, 06.-07. Februar 2003

Bauer B, Weinberger KM, Plentz A, Jilg W
Quantification of BZLF1, BALF5 and BLLF1 mRNA for monitoring of EBV reactivation.
Posterpräsentation, Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Berlin, 26.-29. März 2003

Weinberger B, Plentz A, Jilg W
Quantification of BZLF1, BALF5 and BLLF1 mRNA for monitoring of EBV reactivation in patients after bone-marrow or renal transplantation.
Posterpräsentation, Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Tübingen, 17.-20. März 2004

Barabas S, Bauer T, **Weinberger B**, Püllmann K, Wagner R, Jilg W, Wolf H, Deml L
Induction of MHC class-I and -II restricted epitope presentation by urea-treated Epstein-Barr virus (EBV) BZLF1: A novel technology for the detection of protein-specific cytotoxic T-cells
Posterpräsentation, Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Tübingen, 17.-20. März 2004

Weinberger B, Plentz A, Jilg W
Quantification of BZLF1, BALF5 and BLLF1 mRNA for monitoring of EBV reactivation in patients after bone-marrow or renal transplantation.
Posterpräsentation, European conference on viral diseases (ConVir), Regensburg, 14.-16. Mai 2004

Barabas S, Bauer T, **Weinberger B**, Püllmann K, Wagner R, Jilg W, Wolf H, Deml L
Induction of MHC class-I and -II restricted epitope presentation by urea-treated Epstein-Barr virus (EBV) BZLF1: A novel technology for the detection of protein-specific cytotoxic T-cells
Posterpräsentation, European conference on viral diseases (ConVir), Regensburg, 14.-16. Mai 2004

Weinberger B, Jilg W

Quantifizierung viraler mRNA bei Patienten nach Stammzell- bzw. Nierentransplantation und bei EBV-assoziierten Erkrankungen
Vortrag, BMBF-Meeting Weltenburg, 05.-06. Juli 2004

Barabas S, Bauer T, **Weinberger B**, Püllmann K, Lindner P, Jilg W, Wolf H, Deml L
Induction of MHC class-I and -II restricted epitope presentation by urea-adjuvated soluble proteins: A novel technology for the simultaneous determination of various populations of antigen-specific T-cells
Posterpräsentation, 12th International Congress of Immunology, Montreal, Kanada, 18.-23. Juli 2004

Barabas S, **Weinberger B**, Jilg W, Wolf H, Deml L

Dynamics of Epstein-Barr virus (EBV)-specific T-cell responses in immunocompromized patients after renal transplantation
Posterpräsentation, 12th International Congress of Immunology, Montreal, Kanada, 18.-23. Juli 2004

Weinberger B, Plentz A, Jilg W

Quantification of lytic viral mRNAs for monitoring of Epstein-Barr virus (EBV) reactivation in patients after stem cell or renal transplantation
Posterpräsentation, Biennial meeting of the international association fo research on EBV, Regensburg, 20.-25. September 2004

Barabas S, Bauer T, **Weinberger B**, Püllmann K, Lindner P, Wagner R, Jilg W, Wolf H, Deml L
Induction of MHC class-I and -II restricted epitope presentation by urea-adjuvated soluble proteins: a novel technology for the simultaneous restimulation of various populations of antigen-specific T-cells
Vortrag, Biennial meeting of the international association fo research on EBV, Regensburg, 20.-25. September 2004

Weinberger B, Edsperger F, Jilg W

Quantification of viral load and viral mRNAs for monitoring of Epstein-Barr virus (EBV) reactivation in patients after stem cell or renal transplantation
Posterpräsentation, Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Hannover, 16.-19. März 2004

Veröffentlichungen

Raab U, **Bauer B**, Gigler A, Beckenlehner K, Wolf H, Modrow S

Cellular transcription factors that interact with p6 promoter elements of parvovirus B19.
J Gen Virol, 82 (Pt6), 1473-1480, 2001

Weinberger B, Plentz A, Weinberger KM, Hahn J, Holler E, Jilg W

Quantification of Epstein-Barr virus mRNA using reverse transcription and real-time PCR.
J Med Virol, 74 (4), 612-618, 2004

Weinberger B, Hahn J, Krüger B, Holler E, Krämer BK, Jilg W

Epstein-Barr viral load and viral gene expression in patients after stem cell or renal transplantation.
eingereicht

Danksagung

Ein herzliches Dankeschön meinem Betreuer Prof. Wolfgang Jilg, der sich immer Zeit für mich genommen hat um inhaltliche und konzeptionelle Fragen zu besprechen. Außerdem auch vielen Dank an Prof. Stephan Schneuwly, der als Vertreter der NWF III die Betreuung dieser Arbeit übernommen hat. Die Gespräche mit ihm und „seinen“ anderen Doktoranden haben zur Klärung mancher Fragen beigetragen.

Diese Arbeit wurde am Institut für Med. Mikrobiologie und Hygiene unter der Leitung von Prof. Hans Wolf durchgeführt. Vielen Dank für die Bereitstellung der Laborräume.

Bedanken möchte ich mich auch bei den Ärzten des Instituts, Dr. Stephan Böhm und Dr. Annelie Plentz, die mir in vielen Fragen zu medizinischen Details weiterhelfen konnten, und bei den Ärzten der Transplantationsstationen, die die Blutentnahmen koordiniert haben. Besonderer Dank gilt Dr. Joachim Hahn, der jederzeit für mich erreichbar war und geduldig immer wieder Fragen zu den einzelnen Patienten beantwortet hat.

Allen Mitarbeiterinnen der virologischen Diagnostik danke ich für die gute Zusammenarbeit. Besonders zu erwähnen sind dabei Beate Kammermeier, die alle meine Studien-Sonderwünsche im Eingangslabor koordiniert hat und die „PCR-Mädels“, die einen Teil der DNA-PCRs für mich durchgeführt haben.

Meinen medizinischen Doktoranden Sandra Wegscheid und Florian Edsperger vielen Dank für die Überlassung einiger Daten zu den Themen EBV-DNA bei gesunden Trägern, virale Expression in Zelllinien und latente Transkripte bei Immunsupprimierten.

Dr. Tanja Bauer sorgte für abwechslungsreiche Mittagspausen und ein tolles persönliches Arbeitsklima. Dankeschön außerdem für die Unterstützung beim ELISPOT.

Zuletzt und im Besonderen möchte ich meinen Mann Klaus erwähnen, der mir viele fachliche und methodische Tips geben konnte und immer –wenn auch teilweise aus größerer Entfernung- für mich da war. DANKE!